Kombinatorische Festphasensynthese und

Molecular Modelling Studien von Inhibitoren und

Aktivatoren Signal-transduzierender Enzyme

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

im Fachbereich für Chemie

der Universität Dortmund

angenommene

DISSERTATION

von

Diplom-Chemiker

Lars Kissau

aus Karlsruhe

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. P. Eilbracht

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2002

Die vorliegende Arbeit wurde unter Betreuung von Prof. Dr. H. Waldmann am Institut für Organische Chemie an der Universität Karlsruhe (TH) und an der Universität Dortmund sowie am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund in der Zeit von Februar 1999 bis September 2002 angefertigt.

Meinen Eltern,
Susanne
und Kathrin

1. Einleitung

Alles, was die Natur selbst anordnet, ist zu irgendeiner Absicht gut. Die ganze Natur überhaupt ist eigentlich nichts anderes als ein Zusammenhang von Erscheinungen nach Regeln; und es gibt überall keine Regellosigkeit. Immanuel Kant

Die Existenz und Funktionsfähigkeit eines Organismus sowie einzelner Zellen hängt entscheidend von präzisen Regulationsprozessen ab. Störungen der inter- und intrazellulären Kommunikation haben weitreichende Konsequenzen für die Zellen bzw. den ganzen Organismus. Erkrankungen wie Krebs oder Psoriasis[1,2] sind auf fehlgeleitete Kommunikationsprozesse zurückzuführen. In einem multizellulären Organismus, wie dem Menschen, werden Signale zwischen Organen und Zellen mittels Botenstoffen ausgetauscht. Einerseits existieren Botenstoffe, die Zellmembranen passieren und in der Zielzelle direkt die gewünschte Reaktion hervorrufen können. Die Wirkung von Steroiden auf die Gentranskription[3] ist ein prominentes Beispiel. Andererseits übertragen Botenstoffe ein Signal auf membranständige Rezeptoren, die dieses Signal in das Zellinnere weiterleiten, den primären Botenstoff jedoch nicht passieren lassen. Molekulare Schalter, wie das Protein Ras, spielen im Prozess der intrazellulären Signalweiterleitung eine entscheidende Rolle. Diese Signaltransduktion erfolgt nicht nur über kovalente, posttranslationale Modifikationen von Proteinen, wie Phosphorylierungen/Dephosporylierungen, sondern auch über verschiedene Protein-Protein Wechselwirkungen.[4] Die Regulation der Aktivität von Ras erfolgt einerseits über Konformationsänderungen als auch post-translationale Lipidierungen, wie sie etwa von der Protein-Farnesyl-Transferase (PFT) oder der Geranylgeranyl-Transferasen I durchgeführt werden. Solche, auf dem second-messenger Prinzip beruhende Signaltransduktionsprozesse erfreuen sich steigenden Interesses seitens der Wissenschaft und Industrie. Das gezielte Eingreifen in die Funktion einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase als Anfang solcher Signalkaskaden, sowie die gezielte Beeinflussung der Aktivität des Ras Proteins durch Blockade seiner Lipidierung bzw. durch Umwandlung in eine inaktive Konformation sind Gegenstand dieser Arbeit, die zum besseren Verständnis für zelluläre Vorgänge führen soll und damit im Sinne Kants die Kenntnis der den Erscheinungen in der Natur zugrundeliegenden Regeln vergrößern könnte.

2. Allgemeiner Teil

Das Arsenal der Methoden, die heute der Medizin bei der Behandlung von Tumorerkrankungen zur Verfügung stehen, besteht neben radiologischen Verfahren (Bestrahlungstherapie) aus chirurgischen Eingriffen zur Entfernung des betroffenen Gewebes und dem Einsatz von Chemotherapeutika. Neben anorganischen Verbindungen (cis-Platin)[5] finden hier vermehrt komplexe organische Verbindungen (Taxol, Epothilone)[6,7] Anwendung. Einschränkend wirkt sich jedoch aus, dass Bestrahlung und operative Entfernung des Tumorgewebes nicht bei allen Krebsarten möglich sind, und Chemotherapie oft unselektiv und von starken Nebenwirkungen geprägt ist. Die Ausbreitung von Tumor Zellen in einem Organismus (Metastasierung) kann mit diesen Methoden ebenfalls nur unzureichend gehemmt werden. Zur Entwicklung besonders wirksamer Methoden der selektiven Bekämpfung von Tumorgewebe ist zunächst ein detailliertes Verständnis der molekularen Ursachen der Tumorerkrankungen erforderlich. Hieraus ergeben sich Hinweise auf diejenigen Enzyme, die eine selektive und wirksame Therapie ermöglichen könnten. Der von vielen Pharmaunternehmen verfolgte Ansatz, Wirkstoffe zur Inhibition dieser Enzym-Targets mittels High-Throughput-Screenings von riesigen kombinatorisch erzeugten Bibliotheken zu finden, hat sich als wenig effektiv und sehr kostspielig erwiesen. Trotz enormer Forschungsanstrengungen ist die Zahl der zur Markteinführung gelangten neuen Wirkstoffe und Behandlungsmethoden bedauerlicherweise recht gering.[8] Als Ursache ist der geringe Gehalt pharmakologisch relevanter Gruppen in den Bibliotheken zu sehen. Naturstoffe hingegen stellen biologisch validierte Startpunkte im Strukturraum dar, die von ihren Produzenten als Abwehrstrategie gegen Feinde im Laufe der Evolution erzeugt und optimiert wurden. Da die Tumorentstehung auf eine Fehlsteuerung von Wachstums- und Differenzierungsprozessen zurückzuführen ist, stellen Enzyme, die an solchen Regulationswegen beteiligt sind, attraktive Targets für die sogenannte Signaltransduktionstherapie da. Zu diesen Targets zählen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, das Protein Ras sowie die Farnesyl- und Geranylgeranyltransferasen.

2.1 Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

2.1.1 Historie der Suche nach Kinaseinhibitoren

Nach der Aufklärung der ersten Kristallstruktur einer Kinase (PKA)[9] und der Entwicklung erster ATP-kompetitiver Kinase Inhibitoren, galt es aufgrund des hohen Konservierungsgrades bei den an der ATP Bindung beteiligten Aminosäuren zunächst als schwierig bis unmöglich selektive Kinase Inhibitoren zu entwickeln.[10] In der Tat zeigen viele der bekannten und teilweise sehr aktiven Kinase Inhibitoren eine eingeschränkte Selektivität.[11] Nach der Charakterisierung der PKC[12] und der Entdeckung des ersten PKC Inhibitors Staurosporin **1** im Jahre 1986[13] widmeten sich verschiedene Unternehmen diesem Gebiet. Die hohen Erwartungen wurden jedoch enttäuscht – es befinden sich heute nur wenige Verbindungen in einer klinischen Phase der Evaluierung.[14]

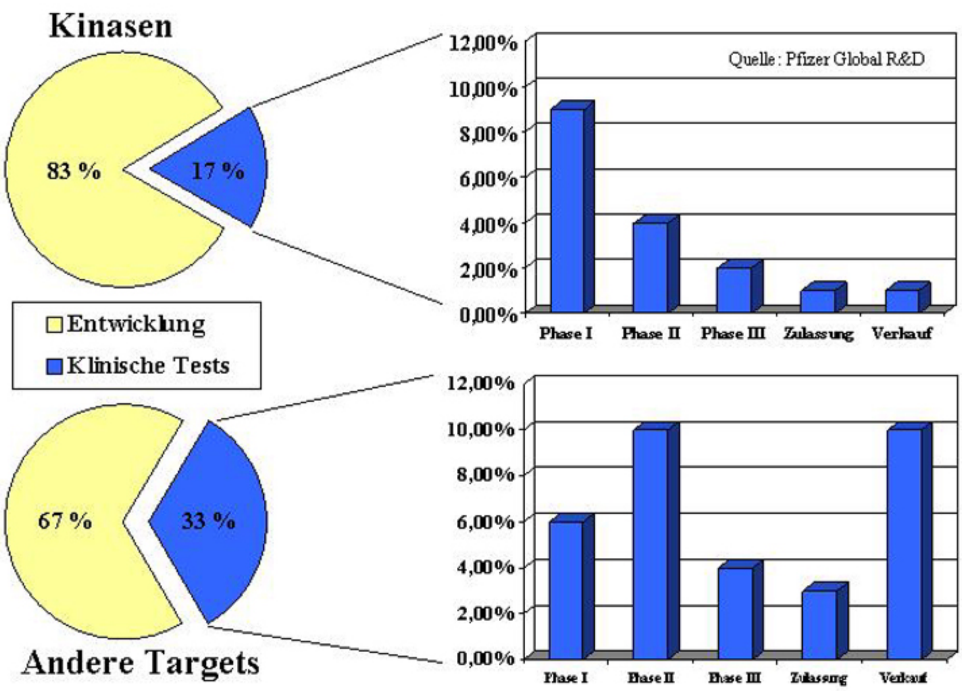
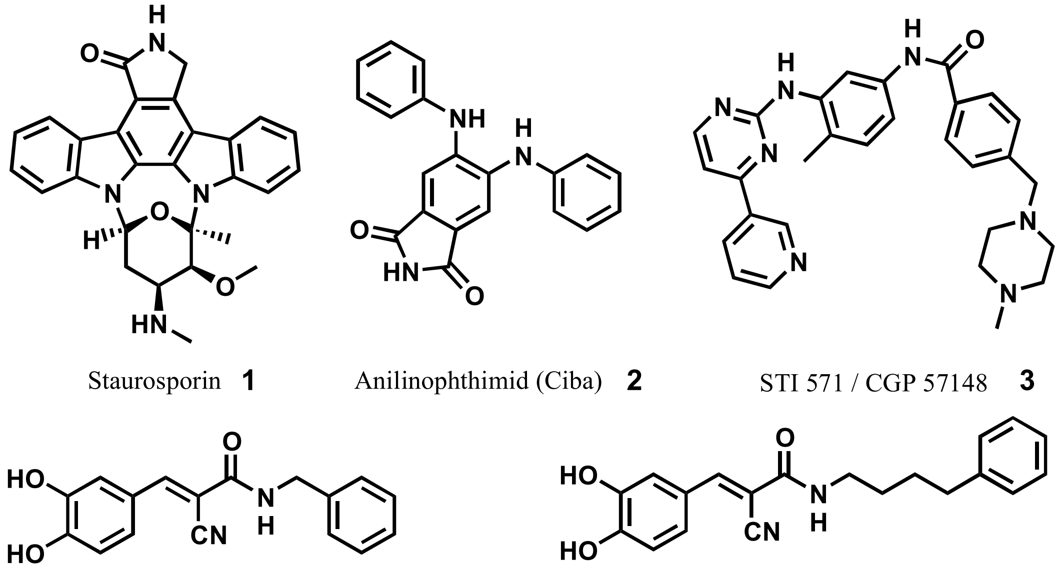


Abbildung 1: Erfolgsquoten bei der Entwicklung von Wirkstoffen gegen Kinasen und gegen andere Targets.

Von den industriell verfolgten Targets ist im Bereich der Kinasen der Prozentsatz derer, für die sich Wirkstoffe in der klinischen Evaluierung oder gar auf dem Markt befinden deutlich geringer, als bei anderen Forschungsbereichen – trotz der gewaltigen finanziellen Anstrengungen. Mehr Verständnis der molekularen Grundlagen und neue Leitstrukturen sind dringend erforderlich. Die erste Euphorie nach der Staurosporin Entdeckung wich bald der Ernüchterung, da die experimentellen Daten durch die 12 Isoformen der PKC (alle mit unterschiedlichen Rollen) verfälscht wurden, und Staurosporin nahezu alle bis dato getesteten Kinasen mit guter bis sehr guter Affinität inhibiert und damit die genannten Befürchtungen bestätigt.[13] Aus der in Abbildung 4 gezeigten Kristallstruktur des PKA/Staurosporin

Komplexes ergibt sich eine Erklärung. Staurosporin bindet kompetitiv zu ATP, aber ausschließlich in einem Bereich der in allen Kinasen hochkonserviert und fast identisch ist. Zu den wenigen echten Erfolgen zählt der Kinaseinhibitor STI 571 (**3**, Handelsname: Gleevec, siehe Abbildung 2) zur Behandlung der Chronisch Myelotischen Leukämie (CML). Diese Erkrankung ist auf eine einzige Genveränderung zurückzuführen. Durch eine sogenannte Philadelphia Translokation wird das BCR Gene vom Chromosom 22 mit dem c-ABL Gene auf Chromosom 9 fusioniert. Es resultiert eine konstitutiv aktive Kinase. STI-571 inhibiert zwar auch andere Kinasen, die Selektivität ist aber offenbar ausreichend um Nebenwirkungen weitestgehend zu vermeiden. Die Inhibition des BCR/c-ABL Fusionsproteins bewirkt eine eindeutig positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs. Das Hauptproblem der Selektivität von Kinaseinhibitoren kann indes nicht als gelöst betrachet werden.



Staurosporin **1** Anilinophthimid (Ciba) **2** STI 571 / CGP 57148 **3**

AG 490 **4** AG 556 **5**

Abbildung 2: Staurosporin und andere Kinaseinhibitoren

Aus der Analyse der Strukturen ergeben sich neben der Konkurrenz zu ATP auch andere Ansatzpunkte für eine Signaltransduktionstherapie auf der Stufe der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Einerseits kann die Diversität der extrazellulären Domäne ausgenutzt werden. Diesen Ansatz verfolgt der von Genentech Inc. entwickelte polyklonale Antikörper „Herceptin“. Andererseits kann intrazellulär die Aktivität der Kinasedomäne auch mit substratkompetitiven Inhibitoren blockiert werden. Ihre Entwicklung setzt allerdings genaue Kenntnisse über Ort und Art der Bindung der Substrate voraus. Die von A. Levitzki[15] entwickelten Verbindungen AG 490 (**4**) und AG 556 (**5**)(siehe Abbildung 2), wirken Substrat-kompetitiv und gehören damit zu den wenigen *in vitro* und *in vivo* erfolgreichen Resultaten dieses Ansatzes.

2.1.2 Strukturelle Eigenschaften und Mechanismus

2.1.2.1 Struktur

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) sind Transmembran-Glycoproteine, die nach Bindung ihrer peptidischen Liganden an die glykosylierte, extrazelluläre Domäne dimerisieren und das extrazelluläre Signal durch Phosphorylierung von Tyrosinresten verschiedener Substrat-Proteine in das Cytoplasma weiterleiten. RTKs aktivieren dadurch zahlreiche Signaltransduktionskaskaden, resultierend in Zellwachstum, -differenzierung oder Veränderungen des Zellmetabolismus. Zu dieser Familie von Proteinen gehören Rezeptoren für Insulin und Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren sowie andere Wachstumsfaktoren wie den Epidermal Growth Factor (EGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) oder Fibroblast Growth Factor (FGF). Daneben gibt es noch zahlreich NRTKs (Nonreceptor tyrosine kinases) die integrale Bestandteile der durch die RTKs aktivierten Signalwege sind. Hierzu gehören z. B. Src, Abl, die Janus Kinasen (Jaks) und die MAP Kinasen.[16] Wie in Abbildung 3 gezeigt, schließt sich an die extrazelluläre Domäne eine Transmembranhelix an. Auf der cytosolischen Seite folgen die Kinase Domäne und der konformativ flexible C-Terminus. Eines der Unterscheidungsmerkmale von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ist die Existenz und Länge einer innerhalb der Kinasedomäne eingeschobene Subdomäne von bis zu 100 Aminosäuren, der sogenannte *Kinase Insert Domain* (KID). Hier, sowie am C-terminalen Ende finden sich einige der Tyrosinreste, die nach Bindung des extrazellulären Liganden einer Autophosphorylierung durch die Rezeptor-Tyrosin-Kinase unterliegen und für die Bindung von Downstream-Effektoren eine entscheidene Bedeutung besitzen[1]. Auf der extrazellulären Seite findet man bei EGFR und ErbB2 sog. Cystein-reiche Domänen, bei den VEGF und FGF Rezeptoren Immunglobulin-ähnliche Domänen und bei Tie und Tie-2 (TEK) sowohl Immunglobulin-ähnliche, als auch EGF-ähnliche und Fibronectin Typ 3 ähnliche Domänen.[17]

Die Aktivierung einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase durch Autophosphorylierung beeinhaltet zwei Prozesse, die Verbesserung der katalytischen Aktivität und die Ausbildung von Bindungsstellen für Downstream-Effektoren. Die Autophosphorylierung von Tyrosinresten im sogenannten *Activation loop* der Kinase Domäne verursacht eine Konformationsänderung in folge derer die ATP Bindungsstelle geöffnet und eine Bindungsstelle für Tyrosin-haltige Pepidketten gebildet wird. Durch die Autophosphorylierung von Tyrosinresten in der KID und der C-terminalen Region enstehen Bindungstellen für Proteine, die Phosphotyrosinreste in spezifischen Sequenzen erkennen, wie z. B. Grb2 oder Grb7. Das Herunterregulieren einer aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinase erfolgt entweder über Endocytose, Ubiquitin abhängigen Abbau oder die Dephosphorylierung durch bestimmte Phosphatasen.

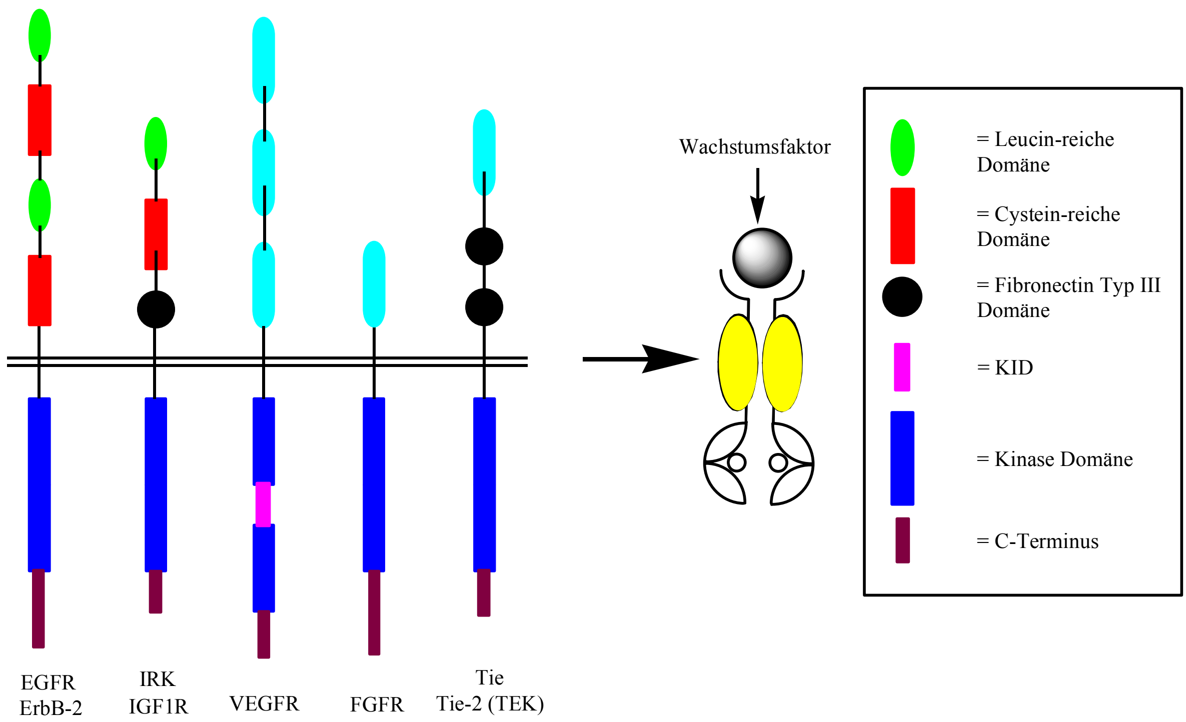


Abbildung 3: Domänen einiger Familien der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen.

Für die vorliegende Arbeit ist die Struktur der Kinasedomäne von besonderem Interesse. Wie in Abbildung 4 gezeigt, trennt eine tiefe Furche die als *N*- bzw. *C-terminal Lobes* bezeichneten Subdomänen. Der *N-terminal Lobe* besteht aus einer β-Faltblattregion und einer α-Helix. Der etwas größere *C-terminal Lobe* besteht nahezu ausschließlich aus α-Helices. ATP bindet in einer Tasche zwischen diesen beiden Hälften die durch die sogenannte *Hinge Region*[*] verbunden sind. Einige Reste in dieser Domäne sind in allen Protein-Kinasen hochgradig konserviert. Dazu gehören zwei Glycinreste im *Nucleotide Binding Loop*, ein Lysin im β-Faltblatt 3 und eine Glutaminsäure in der α-Helix des *N-terminal Lobe*, der sog. C-Helix. Für Bindung und Katalyse ebenfalls wichtig ist die DFG Sequenz am Anfang des *Activation Loop* und die HRDLAARN Sequenz im *C-terminal Lobe*. Die Asparaginsäure in letzterer Sequenz ist für die Katalyse essentiell, da sie entweder durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zum Substrat den Phosphorylierungsschritt begünstigt oder durch elektrostatische Abstoßung die Freisetzung des Produktes beschleunigt.[18] Betrachtet man die Kinasedomäne so, dass die *Hinge-Region* links liegt, findet man hinter der ATP-Bindungstasche eine hydrophobe Tasche, die keine erkennbare Rolle bei der Bindung von ATP oder einem Substrat spielt. Da offenbar eine Selektionsdruck in diesem Bereich fehlt, ist diese Tasche einer der am wenigsten konservierten Bereiche innerhalb der Kinasedomäne und ist daher für die Entwicklung von selektiven Inhibitoren von großer Bedeutung.

---

[*] Anstelle des deutschen Begriffes „Scharnier-Region" wird auch in der deutschsprachigen Literatur die angelsächsische Bezeichnung verwendet.

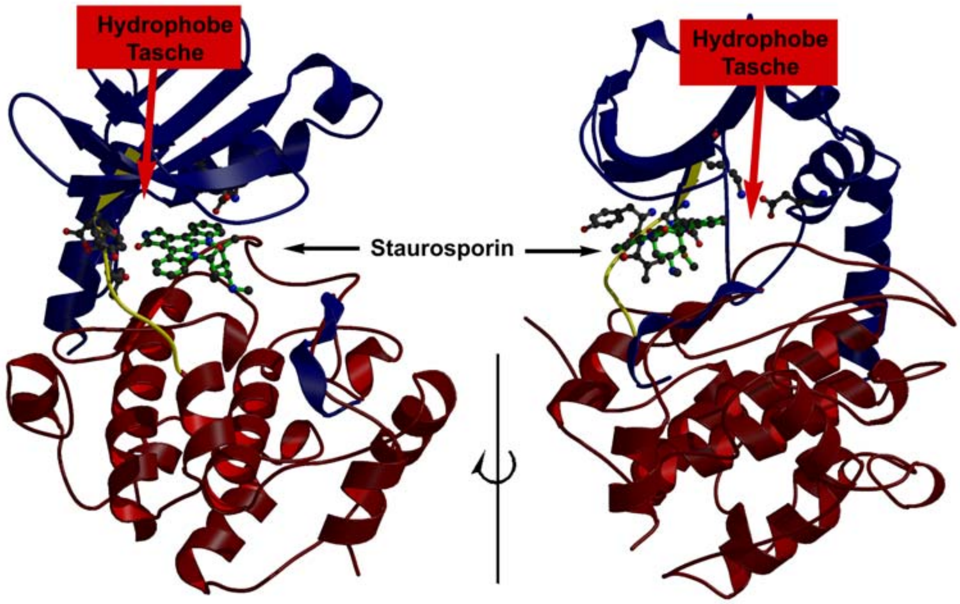


Abbildung 4: Struktur der der α-katalytischen Untereinheit der Protein Kinase A (PKA-Kinasedomäne, PDB Code 1C1Y). In der ATP-Bindungstasche befindet sich der Inhibitor Staurosporin 1. Dieser bindet in der Furche zwischen N- und C-terminalem *Lobes* an die Hinge Region (*N-terminal Lobe* = blau, *C-terminal Lobe* = rot, *Hinge Region* = gelb). Die hydrophobe Tasche hinter der ATP Bindungsstelle ist unbesetzt

2.1.2.2 Mechanismus

Trotz der vorhandenen Aktivierung der Bindung zwischen der β- und γ-Phosphatgruppe des ATP, sind die Reaktionen mit einem Alkohol oder Phenol sowie die Hydrolyse langsame Prozesse. Auch die Spaltung der entsprechenden Phosphorsäureester ist recht langsam, so dass beide Reaktion in biologischen Systemen einer Katalyse bedürfen. Solche langsamen, katalyse-abhängigen Reaktionen sind ideal für die Regulation von biologischen Vorgängen, und in der Tat gilt die reversible Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen als einer der wichtigsten regulatorischen Vorgänge in Zellen.[19] Die beteiligten Enzyme werden gewöhnlich ihrer Substrat-Spezifität entsprechend klassifiziert. Den Serin/Threonin Kinasen (S/TK), Tyrosin Kinasen (TK) und und *Dual-Function* Kinasen (DFK) entsprechen die Serin/Threonin Phosphatasen, Tyrosin Phosphatasen bzw. die Dual-spezifischen Phosphatasen.

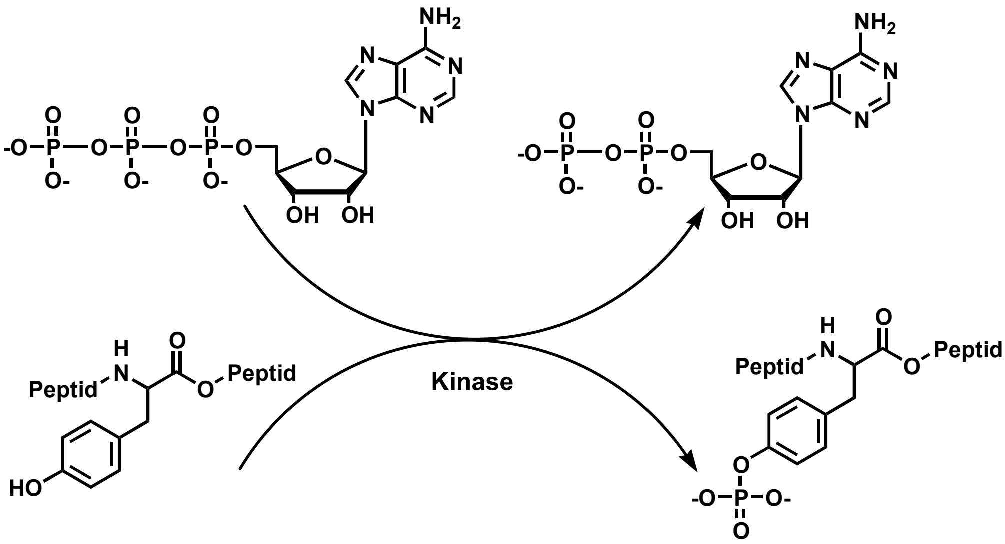


Abbildung 5: Reaktion, die durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen katalysiert wird

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sind in Abwesenheit eines extrazellulären Liganden inaktiv. Eine Blockade durch andere Proteine, ähnlich zur Wirkung der Rinder-Pancreas-Trypsin Inhibitors[3] oder der PKA,[20] konnte bislang nicht nachgewiesen werden, eine Autoinhibition scheint plausibel. In den Kristallstrukturen der Kinasedomänen von Tie-2 und des FGF1 Rezeptors finden sich Hinweise auf mögliche Autoinhibitionsmechanismen. Im Falle des FGF1 Rezeptors blockieren Teile des *Activation Loop* in der Struktur der inaktiven Kinase die Bindungsstelle für Substratpeptide. In der Struktur von Tie-2 ist die ATP Bindungstasche durch Teile des *Nucleotide Binding Loops* belegt. Durch die Dimerisierung und damit verbundene Konformationsänderungen wird die Autoinhibition aufgehoben und die Phosphorylierung von Tyrosinresten z. B. in der KID ermöglicht. Hierdurch entstehen Bindungsstellen für die Downstream-Effektoren. Beim Vergleich der phosphorylierten und nicht phosphorylierten Strukturen der verschiedenen Kinasen wird deutlich, dass Enzyme aus dieser Klasse sehr flexibel sind und auf die Bindung von Liganden mit deutlichen Konformationsänderungen reagieren. So ist der Abstand, der für die Koordination der Phosphate essentiellen Aminosäuren Lysin 855 sowie Glutaminsäure 872 in der unphosphorylierten Tie-2 Struktur mit 7.2 Å deutlich größer, als die aus Strukturen aktivierter Kinasen bekannte Distanz von 3-4-Å. Ähnliche Differenzen findet man in den inaktiven und aktiven Form der Cdk2 Kinase (8.5 Å und 3.6 Å). Grund ist jeweils die Verschiebung der gesamten α-Helix im *N-terminal Lobe,* teilweise um bis zu 5 Å. Nicht nur innerhalb einer Subdomäne ist die Flexibilität signifikant, auch die relative Orientierung der N und C terminalen Subdomänen zeigt in verschiedenen Protein Kinase Strukturen eine beträchtliche Variabilität.[21] Die beiden Subdomänen im unphosphorylierten FGF Rezeptor 1 weisen eine geöffnete Form auf. Die Rotation beider Domänen im Vergleich zur phosphorylierten aktiven Kinase beträgt ~ 20 °.[22] Diese Beweglichkeit ist Grund für die angelsächsische Bezeichnung der Furche als *Hinge Region* (Scharnier-Region). Alle Rezeptor-Tyrosin-Kinasen benötigen ein Mg^{2+} um den Transfer des Phosphates zu katalysieren. Die Spezifität der Kinasen wird durch jeweils drei Reste C und N

terminal von der zu phosphorylierenden Aminosäure des Substrates bestimmt. Die Affinität des Substrates wird jedoch auch teilweise von Domänen kontrolliert, die bis zu 100 Aminosäuren *N*-terminal zur Phosphorylierungstelle im Substratprotein liegen.[23] Trotz zahlreicher kinetischer Untersuchungen ist der genaue Reaktionsverlauf noch nicht bekannt. Vieles spricht für einen random Bi-Bi Mechanismus, bei dem entweder Substrat oder ATP zuerst binden. Eine Generalisierung für alle Kinasen ist auf Basis der vorliegenden Daten nicht möglich.[24,25] Die Reaktion verläuft ohne ein Phosphoenzym-Intermediat.[26] Im Gegensatz zur GTPase-Reaktion (siehe Abschnitt 2.2.2.1), die über eine assoziativen Mechanismus verläuft, sprechen experimentelle Daten im Falle der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen für einen dissoziativen Mechanismus, bei dem die Bindung des γ-Phosphates zum ADP im Übergangszustand bereits weitgehend gebrochen ist.[23]

2.1.3 Rolle in der Signaltransduktion

In Anhang XI (Doppelseite zum Ausklappen) sind die in dieser Arbeit betrachteten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen als Bestandteil verschiedener Signaltransduktionskaskaden gezeigt. Die in dieser Arbeit verfolgten Ansatzpunkte für einen gezielten Eingriff sind durch rote Balken gekennzeichnet. Aus der Menge der bekannten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wurden folgende Enzyme aufgrund ihrer Rolle in verschiedenen Signalkaskaden ausgewählt: IGF1R, Tie-2 (TEK), VEGFR-2 (KDR), VEGFR-3, ErbB-2. Wie eingangs erwähnt, stellt die Ausbreitung von Tumorzellen in einem Organismus ein großes Problem dar. Ein Tumor benötigt ab einer gewissen Größe eine direkte Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die Tumorzellen produzieren entsprechende Wachstumsfaktoren (z. B. die VEGFs) und veranlassen dadurch Endothelzellen benachbarter Gefäße zur Differenzierung. Für die Metastasierung ist es bedeutsam, dass auf diesem Weg nicht nur eine Verbindung zu den Blutgefäßen des Organismus sondern auch zum Lymphsystem entsteht. Das Gefäßsystem wird durch einen zweistufigen Prozess aufgebaut (siehe Abbildung 6). Zunächst werden Endothelialzellen zur Differenzierung angeregt und bilden eine grobes Netzwerk verbundener Gefäße. Nach dieser Vaskulogenese erfolgt ein weiterer Umbau dieser Zellen, das Netzwerk wird erweitert und nicht-endotheliale Zellen werden zur strukturellen Unterstützung rekrutiert. Die Vasculogenese wird durch den vascular endothelial growth factor (VEGF) und die entsprechenden Rezeptoren VEGFR1-3 kontrolliert. Der zweite Entwicklungsschritt, die Angiogenese hängt von anderen Faktoren und Rezeptoren ab, unter Anderem von Angiopoetin 1, einem Liganden für die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Tie-2.

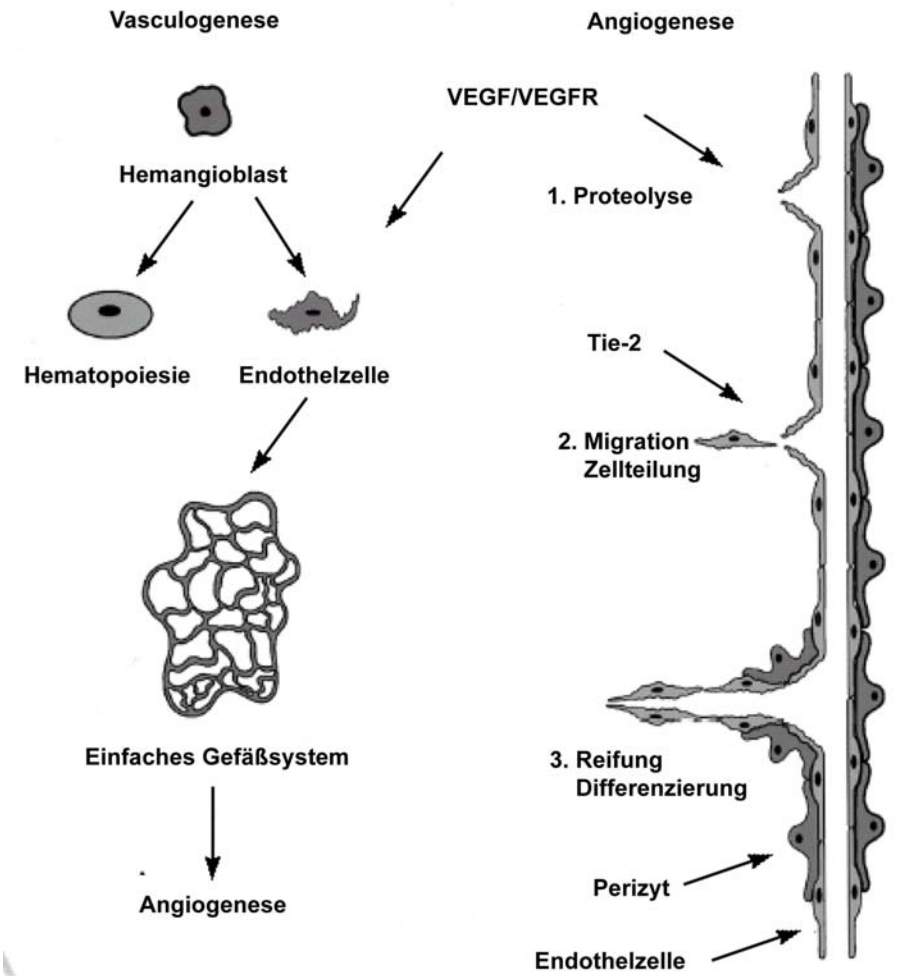


Abbildung 6: Schematische Übersicht der Vasculo- und Angiogenese[27]

2.1.3.1 VEGFR-2 (KDR)

VEGFR-2 leitet Wachstumssignale auf den Ras-Pfad über die Bindung von Grb2 weiter. Daneben bindet der aktivierte VEGF Rezeptor 2 auch PLCγ und aktiviert über die Ausschüttung von Diacylglycerin (DAB) und Inositoltriphosphat (IP3) die Protein Kinase C. Deren Bedeutung für das Tumorwachstum führte, wie bereits erwähnt, zu intensiven Untersuchungen und der Entdeckung von Staurosporin **1** als PKC Inhibitor.

2.1.3.2 VEGFR-3

VEGFR-3 ist insbesondere für die Lymphangiogenese bedeutsam, was diese Rezeptor-Tyrosin-Kinase in Anbetracht der Verbreitung von Metastasen über das Lymphsystem zu einem ebenfalls hochinteressanten Target macht. Kaipainen et al. konnten zeigen, dass dieser Rezeptor zunächst nur während bestimmter Phasen der Entwicklung des menschlichen Embryos exprimiert wird, und später ausschließlich im lymphatischen Gewebe zu finden ist.[27] Dies macht VEGFR-3 zu einem hochattraktiven Target für anti-Tumorwirkstoffe, da Einflüsse auf andere Gewebe (Nebenwirkungen) nicht zu erwarten sind.

2.1.3.3 Tie-2 (TEK)

Während die Aktivierung von VEGFR-2 für die Initiierung der Vaskulogenese und Angiogenese erforderlich ist, führt die Aktivierung von Tie-2 zu Modifikationen von Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen wodurch das die Gefäße umgebende Gewebe verändert wird. Diese Veränderungen beinhalten die Auflösung alter Strukturen der die Endothelzellen umgebenden Matrix, wodurch erst Platz für neue Gefäße entsteht. Tie-2 kontrolliert danach auch die Differenzierung der Zellen beim Aufbau von Strukturen, die neue Blutgefäße stützen. Möglicherweise sind diese Effekte auf die in Anhang XI angedeutete Verbindung von Tie-2 mit der Fokal Adhesion Kinase (FAK), einem zentralen Element der Integrin-abhängigen Signalwege zurückzuführen. Letztere sind für Modifikationen von Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen von großer Bedeutung.[28] Neben der Inhibierung der VEGFRs, um die Differenzierung von Endothelzellen zu unterdrücken, ergibt sich aus dieser Rolle ein weiterer potenter Ansatzpunkt für die Bekämpfung von Tumoren.

2.1.3.4 ErbB-2

Die Bedeutung einer sorgfältigen Regulation dieses gesamten Prozesses und insbesondere der Dimerisierung wird am Beispiel der ErbB-2 Rezeptor-Tyrosin-Kinase besonders deutlich. ErbB-2 (auch Her-2/Neu genannt) bildet neben Homodimeren auch Heterodimere mit anderen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und moduliert dadurch eine Vielzahl von Signalkaskaden. Ein Austausch von Valin 664 in Her-2/Neu zu Glutaminsäure führt zu konstitutiver Dimerisierung und entsprechend gesteigerter Kinaseaktivität.[29] Da kein für Her-2 spezifischer Wachstumsfaktor gefunden werden konnte, gilt die Bildung von Heterodimeren mit anderen RTKs aus der EGF Familie und die dadurch bedingte Verstärkung von Wachstumssignalen als Hauptaufgabe von Her-2. Her-2 Heterodimere sind für die Transmission eines Signals an Ras und MAPK nicht nur essentiell, sondern steuern offenbar auch die Stärke des Signals. [30] Eine neuere Untersuchung belegt die Wichtigkeit der EGF/Her-2 Heterodimere. Demnach sind in 60 % aller soliden Tumore diese Rezeptorsysteme am fehlgesteuerten Wachstum beteiligt.[19]

2.1.3.5 IGF1R

Ein Beispiel für die angesprochenen durch RTKs gesteuerten metabolischen Veränderungen ist die Insulin Rezeptor-Tyrosin-Kinase (IRK), die nach Bindung von Insulin an die extrazelluläre Domäne durch Phosphorylierungen sogenannter IRS Proteine an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert. Die Aktivierung der Phosphoinositol 3-Kinase (PI-3K) durch phosphorylierte IRS gilt als kritischer Schritt bei der Translokation von Glucosetransportern zur Zellmembran, die nachfolgend die Glucoseaufnahme in die Zelle erleichtern.[31,32] Eng verwandt mit dem Insulin Rezeptor (~80 % Identität innerhalb der Kinasedomäne) ist der Insulin-like-Growth-Factor-Receptor-1 (IGF1R). Die Apoptose wird in Zellen durch die Expression sogenannter *Survival Factors* unterdrückt. Der IGF1 ist ein solcher *Survival Factor*. Die Rezeptor-Tyrosin-Kinase IGF1R übt die anti-apototische Wirkung über die

Phosphorylierung von Substraten aus, die wiederum die Aktivität von Mitgliedern der Bcl-2 Enzymfamilie modulieren. Zwischen der Her-2 Kinase und dem IGF1 Rezeptor besteht eine kürzlich entdeckte, hochinteressante Verbindung. Das von der Firma Genentech vertriebene Herceptin bindet als polyklonaler Antikörper an Her-2 Rezeptoren auf der Oberfläche von Krebszellen. Es induziert dadurch eine Reihe von Folgeerscheinungen die zur Apoptose der Zelle führen. Die klinische Anwendung bei Her-2 überexprimierenden Brusttumoren wurde leider oft durch die Bildung von Resistenzen der Krebszellen gebremst.[33] Kürzlich wurde gezeigt, dass die anti-apoptotische Wirkung des IGF1 vermittelt durch den in den Tumorzellen nach Herceptin Behandlung überexprimierten IGF1 Rezeptor für diese Resistenzentwicklung verantwortlich ist. Wird IGF1R durch einen Antikörper blockiert, ist die Krebszelle wieder gegen Herceptin empfindlich. Daraus folgt unmittelbar, dass die Entwicklung eines IGF1R Inhibitors für die Krebstherapie, insbesondere bei Her-2 überexprimierendem Brustkrebs, von großer Bedeutung ist.

2.1.4 Startpunkt der Untersuchungen

Ausgangspunkt der in Kapitel 4.2 beschreibenen Arbeiten war die erfolgreiche Totalsynthese der ErbB-2 Kinaseinhibitors Nakijichinon C (siehe Abbildung 5) durch Dr. P. Stahl im Arbeitskreis von Prof. Dr. H. Waldmann, sowie die im Anschluß durchgeführte Synthese einiger Analoga.

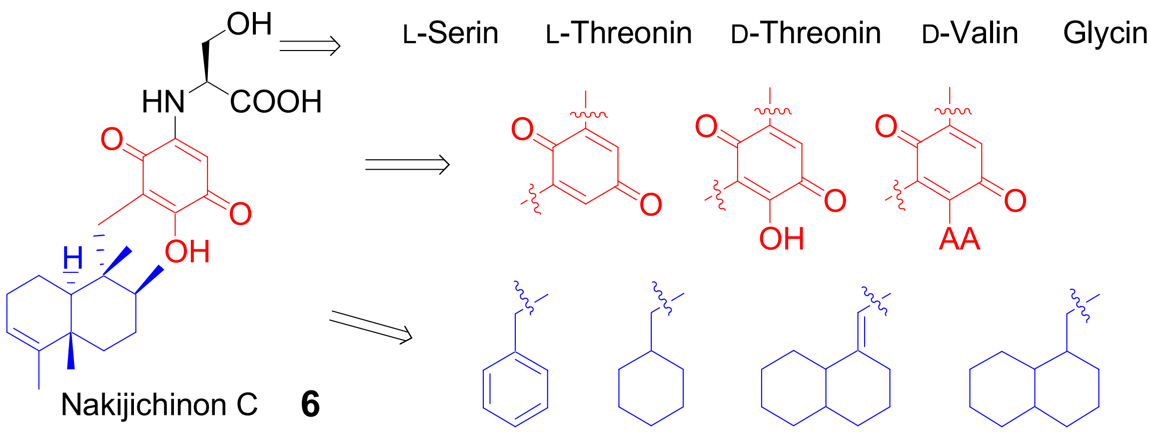


Abbildung 7: Struktur des Naturstoffes Nakijichinon C (6). Für die Synthese der Analoga wurden die drei Bestandteile wie gezeigt variiert.

Aus der Evaluierung dieser Bibliothek, in Koorperation mit Dr. R. Mazitschek im Arbeitskreis von Prof. A. Giannis (Universität Karlsruhe), stammen die in dieser Arbeit angegebenen IC_{50} Werte. Demnach befinden sich in der Substanzbibliothek von 74 Verbindungen insgesamt 7 Inhibitoren für IGF1R, Tie-2, VEGFR-2 und VEGFR-3 und ErbB-2 (Her-2). Diese Verbindungen fungieren als ATP kompetitive Inhibitoren, allerdings kann aus den Strukturen keine Ursache für die vielversprechende Selektivität abgeleitet werden. Die micromolare Aktivität der Inhibitoren ist zwar beachtlich, in Anbetracht der intrazellulären millimolaren Konzentrationen von ATP für eine Anwendung *in vivo* aber nicht ausreichend. Ein detailliertes

Verständnis der Wirkung der Nakijichinon Analoga ist Voraussetzung für die Steigerung der Aktivität.

2.2 Ras als Target

2.2.1 Stellung in der Signaltransduktionskaskade und Regulation

Wie aus dem Schema in Anhang XI ersichtlich, hat das Protein Ras eine zentrale Bedeutung als molekularer Schalter in der Zelle inne. Dass Fehler in der Regulation der Aktivität eines solchen zentralen Schalters in intrazellulären Signalkaskaden erhebliche Auswirkungen haben können, wird durch die Häufigkeit von Mutationen in für Ras codierenden Genen (ca. 30 % aller menschlichen Tumore) eindrucksvoll belegt.[34] Ras wurde als zentrales Gen in Tumorviren von Nagern entdeckt, der Name leitet sich von „Rat Sarcoma“ ab. Das Ras p21 Protein gehört zu einer Ras-Superfamilie von GTP bindenden Proteinen zu der auch Rho/Rac, Rab, und Ran gehören. Diese zu mindestens 30 % homologen Proteine üben ähnliche Funktionen aus. Rho/Rac fungieren downstream von Ras und spielen für die Morphogenese und Organisation des Cytoskelets eine Rolle. Rab-Proteine spielen beim Targeting von Vesikeln für die entsprechenden zellulären Kompartimente eine Rolle.[35] Wie Ras, müssen alle diese Proteine in ihrer GTP-gebundenen Form vorliegen um aktiv zu sein.[36] Im Falle der Ras/MAP-Kinase-Signaltransduktionskaskade werden die phosphorylierten Rezeptoren vom growth factor receptor binding protein (Grb2) erkannt. Die phosphorylierte Sequenz der Rezeptor-Tyrosin-Kinase wird über die SH2 Domäne des Grb2 gebunden. Grb2 lokalisiert in der Folge das Protein Sos mittels zweier SH3 Domänen an der Innenseite der Zellmembran. Der Komplex aus Grb2 und Sos wirkt auf die inaktiven GDP-bindende Form von Ras als Guaninnucleotid-Austauschfaktor (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF). Durch den Austausch von GDP gegen GTP wird Ras aktiviert und leitet als molekularer Schalter das von der Rezeptor-Tyrosin-Kinase über nicht kovalente Protein-Protein Wechselwirkungen eintreffende Signal auf eine Kaskade von Protein-Phosphorylierungen ins Zellinnere um. Die aktivierte, GTP-bindende Form von Ras vermag den N-Terminus der S/T spezifischen Proteinkinase Raf zu binden und dieses Protein dadurch an der Innenseite der Zellmembran zu lokalisieren. Raf bindet und phosphoryliert mit seinem C-Terminus die MAP-Kinase-Kinase, welche das Signal über weitere Phosphorylierungen transmittiert. Für das „Ausschalten“ des Schalters ist ebenfalls ein zweites Protein erforderlich. Die intrinsischen GTPase-Aktivität von Ras ist sehr niedrig und wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP) beschleunigt. Dieser Signalweg ist in Anhang XI rot markiert. Die drei humanen Ras Proteine werden posttranslational durch Lipidierung am C-Terminus modifiziert und sind erst nach dieser Modifikation an der Zellmembran lokalisiert. Dies ist eine für die biologische Aktivität notwendige jedoch nicht hinreichende Voraussetzung.

2.2.2 Ansatzpunkte für Signaltransduktionstherapie

Aus seiner Stellung in der Signalkaskade, der Tatsache, dass die Lipidierung des *C*-Terminus für die Aktiviät essentiell ist sowie dem bekannten Wechsel zwischen der inaktiven GDP-bindenden Konformation und der aktiven GTP-bindenden Konformation, leiten sich einige vielversprechende Ansätze zur Entwicklung von anti-Tumor Therapeutika ab. Neben der Inhibition der durch das Enzym Farnesyltransferase katalysierten Prenylierung sollte auch durch Beeinflussung der GTPase-Reaktion ein Unterbinden der unerwünschten Weiterleitung von Signalen möglich sein.

2.2.2.1 GTP-GDP Austausch

Ras besitzt eine intrinsische GTPase-Aktivität, wobei im Sinne einer Substrat-beschleunigten Katalyse GTP selbst als allgemeine Base fungiert.[37] FTIR Untersuchungen stützen die Annahme eines assoziativen Mechanismus über ein pentavalentes Phosphoratom an, in dessen Verlauf sich am γ-Phosphat eine negative Ladung aufbaut.[38,39]. Die intrinsische GTPase-Reaktion ist jedoch sehr langsam. Das Protein GAP (*GTPase activating protein*) erhöht die intrinsische GTPase-Aktivität von Ras und sorgt dadurch dafür, dass Ras wieder deaktiviert wird – die sogenannte „Switch-off“ Reaktion des molekularen Schalters. Der Mechanismus dieser Wirkung wurde von Wittinghofer et al.[34] in zahlreichen Experimenten beleuchtet. Für die GAP-katalysierte GTPase-Reaktion von Ras konnte ein k_{cat}-Wert von 5-20 s^{-1} ermittelt werden, der ca. 10^5-mal größer ist als der der nichtstimulierten Reaktion.[34] Die 1997 von K. Scheffzek et al. aufgeklärte Struktur des Komplexes zwischen dem menschlichen H-Ras Protein und dem GTPase-aktivierenden Protein $p120^{GAP}$ (siehe Abbildung 8) lieferte einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der molekularen Ursachen der transformierenden Wirkung von Mutationen im für Ras codierenden Gen, die zu einem Austausch von Glycin 12 zu Valin oder Prolin führen.[40]

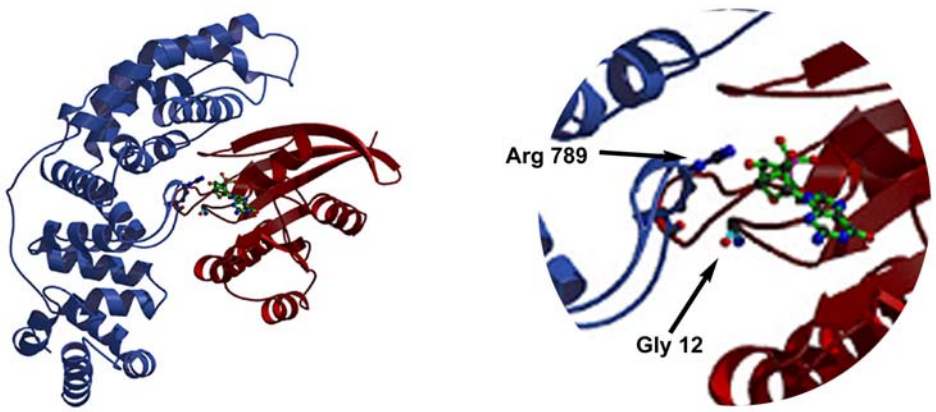


Abbildung 8: Struktur des Ras-GAP Komplexes. In der Vergrößerung rechts sind die wichtigen Aminosäuren in der Nähe des GTP Bindungstasche gezeigt.

Aus der Kristallstruktur ist zu erkennen, dass die Seitenkette von Arginin 789 von GAP-334 in die GTP Bindungstasche von Ras ragt. Dort neutralisiert die Guanidiniumgruppe die im Verlauf der GTP Hydrolyse entstehenden negativen Ladungen. Des Weiteren stabilisiert GAP die sogenannte Switch II Region von Ras, wodurch es Glu-61 ermöglicht wird im Sinne einer allgemeinen Basenkatalyse die Hydrolyse von GTP zu GDP und P_i zu beschleunigen. Eine Betrachtung der vdW-Radien belegt, dass Gly-12 im Übergangszustand in direktem Kontakt zu Arg-789 und Glu-61 steht. Bei den Ras-Mutanten G12V und G12P ist also eine korrekte Orientierung von GAP-Arg –789 und Ras-Glu-61 nicht möglich. Damit kann der störende Einfluß der G12V und G12P Mutationen auf die Bildung des Ras-GAP Komplexes als die molekulare Ursache für die transformierende Wirkung dieser Mutationen betrachtet werden.

2.2.2.1.1 **Ausgangspunkt der Untersuchungen**

1999 machten A. Wittinghofer et al.[41-44] die Entdeckung, dass DABP-GTP **7** von den G12V und G12P Mutanten des H-Ras Proteins hydrolysiert werden kann. Damit war nahe gelegt, dass kleine Moleküle dieselbe Wirkung erzielen könnten wie GAP. Diese Entdeckung gab Anlaß zur Suche nach einem kleinen Molekül, das die intrinsische GTPase Reaktion beschleunigen könnte. Die anfängliche Vermutung, die 4-Aminogruppe am Benzophenon könnte mittels allgemeiner Basenkatalyse den Angriff eines Wassermoleküls auf das γ-Phosphat begünstigen, konnte durch NMR- Untersuchungen und die Isolierung des Reaktionsproduktes **8** (siehe Abbildung 9) widerlegt werden.[45]

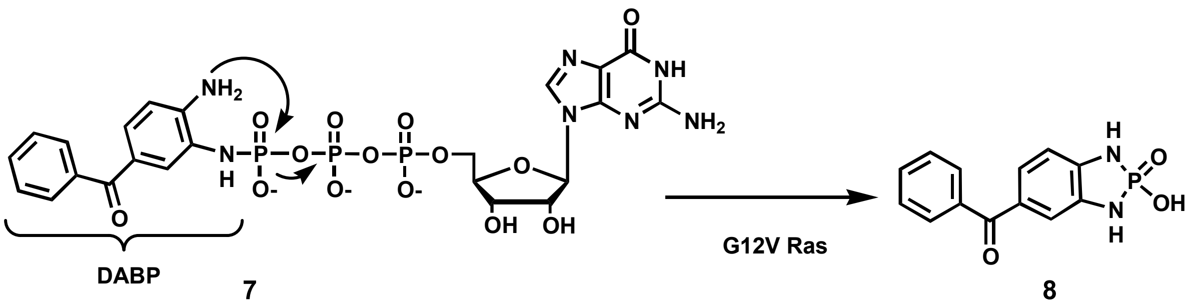


Abbildung 9: Hydrolyse von DABP-GTP (7) durch G12V Ras.

Da die Affinität von Ras zu DABP-GTP **7** im Vergleich zu GTP um den Faktor 400 geringer ist, muss der Benzophenon-Einheit ein negativer Bindungsbeitrag zugeschrieben werden. Die Kristallstrukturen der G12P Mutante (PDB Code 1CLU) und der G12V Mutante (PDB Code 1RVD) zeigen deutlich, dass zwischen den Phenylringen und Ras keine bindende Wechselwirkung besteht. 3,4-Diaminobenzophenon scheidet daher als Leitstruktur für die Entwicklung eines Ersatz-GAP aus.

2.2.2.1.6 Ansatzpunkte für die Signaltransduktionstherapie

Um die transformierende Wirkung einer GTPase hemmenden Mutation aufzuheben, wäre die Blockade der GTP Bindungstasche ein scheinbar vielversprechender Ansatz. Die Entwicklung GTP kompetitiver Inhibitoren, die den Wechsel in die aktive Konformation verhindern sollten, ist aufgrund der millimolaren Konzentration von GTP in der Zelle und dessen hoher Affinität

zu Ras (K_d = 10 pM) nicht praktikabel.[34] Des Weiteren wäre hier die Möglichkeit zur Differenzierung zwischen verschiedenen GTP bindenden Proteinen aufgrund des hohen Konservierungsgrades der beteiligten Aminosäuren stark eingeschränkt und würde zu einer Problematik führen, wie sie für ATP kompetitive Kinaseinhibitoren bereits diskutiert wurde. Die aus den Versuchen mit DABP-GTP entstandene Idee einer Restoration der GTPase-Aktivität durch ein kleines Molekül, das bei Mutanten des Ras-Proteins die Rolle von GAP einnehmen könnte, unterliegt hingegen keinen solchen Einschränkungen und wurde daher in einem weiteren Projekt in dieser Arbeit aufgegriffen.
Das Konzept, eine durch Mutationen gestörte biologische Aktivität eines Proteins durch ein kleines Molekül wiederherzustellen, wurde bereits von P.G. Schultz et al.[46] sowie J. T. Koh et al.[47] realisiert. Der entscheidende Unterschied zu diesem Projekt liegt darin, dass in beiden Fällen bekannte und sehr spezifische Bindungstaschen für kleine Moleküle durch Mutationen abgewandelt wurden und anschließend veränderte Liganden in diesen modifizierten Taschen binden konnten. Um die GTPase Aktivität von Ras zu verbessern ist jedoch die Bindung an der Oberfläche notwendig und der natürliche Ligand ist kein kleines Hormon sondern ein 337 kDa Protein (GAP). Auch ist hier das Ziel nicht eine artifiziell erzeugte Mutante, sondern eine biologisch relevante Mutation.

2.2.2.2 Posttranslationale Lipidierung durch die PFT

Bei der Biosynthese der lipidierten Ras Proteine wird zunächst der Cysteinrest der *C*-terminalen CAAX Sequenz durch PFT-katalysierte Reaktion mit Farnesylpyrophosphat farnesyliert, anschließend der AAX Teil durch eine spezifische Protease abgespalten und schließlich der freie C-terminale Cysteinrest in den Methylester überführt. Im Falle von H- und N-Ras erfolgt eine zweite Lipidierung mit Palmitinsäure, während bei K-Ras die Interaktion mit der Membran durch eine positiv geladene poly-Lysin Sequenz verstärkt wird.[34]

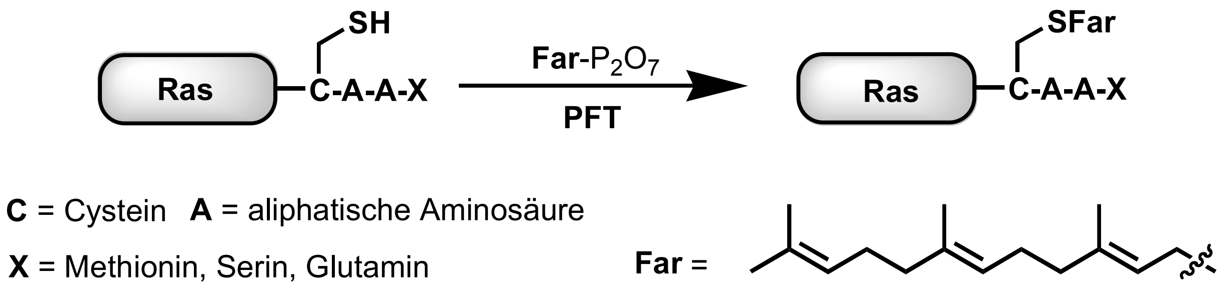


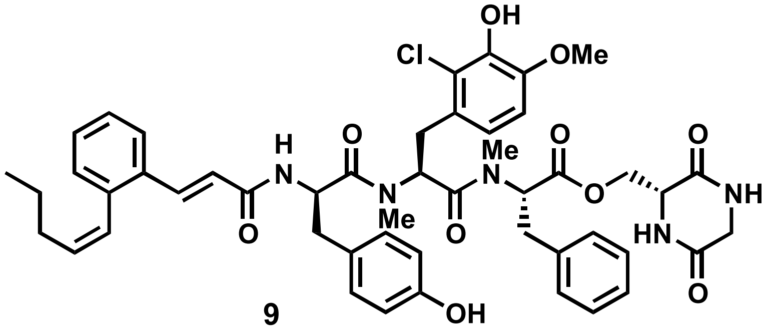
Abbildung 10: PFT katalysierte Farnesylierung von Ras

Für die transformierende Wirkung von mutierten Ras-Proteinen ist die Farnesylierung essentiell, da hierdurch die für die biologische Aktivität erforderliche Lokalisierung an der Plasmamembran sichergestellt wird.[48] Tatsächlich zeigen Inhibitoren der PFT Anti-Tumoreffekte, sie hemmen das Wachstum von transformierten Zellen oder bewirken Tumorregression, wobei letztere Wirkung auf das Auslösen von Apoptose, den programmierten Zelltod, zurückgeführt wird.[49] Dennoch ist die Wirkung nicht einheitlich und hängt von Wirkstoff, Tumorzelle und Art der Mutation ab. Es gibt Hinweise, dass PFT

Inhibitoren auch die Funktionsfähigkeit anderer Proteine in der Ras-Superfamilie (außer Ras selbst) beeinflussen. RhoA und Rac1 müssen, um ihre volle Funktion zu entfalten, beispielsweise geranylgeranyliert werden. Die beobachteten anti-Tumor-Aktiviäten von PFT Inhibitoren könnten ihre Wirkung also auch anders entfalten. Möglicherweise ist die Apoptose-induzierende bzw. die anti-Tumor Wirkung einiger PFT Inhibitoren nicht auf die Inhibition der PFT sondern auf die Inhibition anderer Enzyme zurückzuführen. Für die Klärung dieser Fragestellung bedarf es hochselektiver Inhibitoren, die andere Prenyltransferasen, wie z.B. die GGTase I, nicht beeinflussen. Da PFT und GGTase I identische α-Untereinheiten aufweisen und sich lediglich in einigen Resten in der β-Untereinheit unterscheiden ist letzteres Ziel nicht leicht zu erreichen. Daneben ist bekannt, dass K-Ras aufgrund der etwas unpolareren CAAX Box auch ein Substrat der GGTase I sein kann und daher trotz PFT Inhibition mittels Geranylgeranylierung an der Plasmamembran lokalisiert werden kann.[50] Eng verwandt mit den Prenyltransferasen PFT und GGTase I ist die GGTase II (oder RabGGTase), die zwei Geranylgeranylreste auf den C-terminus der Rab Proteine überträgt.[35] Da auch diese eine Rolle in den hier betrachteten Signalkaskaden spielen, sind Substanzen, die eine gezielte Inhibition einer der drei Prenyltransferasen erlauben von großem Interesse.

2.2.2.2.1 Ausgangspunkt der Untersuchungen

Von den vielen, *in vitro* hochaktiven PFT Inhibitoren haben nur wenige die klinischen Phasen der Evaluierung erreicht bzw. überstanden.[51] Trotz der teilweise bemerkenswerten Wirksamkeit ist die Hemmung der Ras Farnesylierung in vivo vermutlich nicht das relevante Ziel.[52] Die Ursachen für die Tatsache, dass verschiedene Tumorzelllinien unterschiedlich auf diese Inhibitoren reagieren sind auch nicht hinreichend bekannt. Neben neuen Wirkstoffen sind Werkzeuge zur detaillierten Aufklärung der von Lipidierungen beeinflussten Signalkaskaden notwendig. Nach der erfolgreichen Totalsynthese des peptidischen Naturstoff Pepticinammin E[53,54] und dem Nachweis der Inhibition der PFT wurde diese Verbindung als biologisch validierter Startpunkt für das Design einer Bibliothek von PFT Inhibitoren zugrunde gelegt. Die biologische Evaluierung dieser ersten Generation von Inhibitoren zeigte einige interessante Resultate, allerdings waren diese nicht einfach zu rationalisieren. Die weitere Verbesserung der Aktivität und Selektivität und die damit verbundene Entwicklung optimierter Wirkstoffe und Werkzeuge ist für ein detailliertes Verständnis der Wirkungsweise essentiell.



9

Abbildung 11: Struktur des natürlichen PFT Inhibitors Pepticinnamin E

2.3 Entwicklung von Leitstrukturen und Optimierung von Inhibitoren

2.3.1 Leitstrukturentwicklung

Beim Design und der Entwicklung von Leitstrukturen für Wirkstoffe ist es von grundlegender Bedeutung, die Art der zu beeinflussenden Wechselwirkung zu berücksichtigen. Das geforderte Eigenschaftsprofil für Wirkstoffe, die die enzymatische Wirkung eines Proteins inhibieren sollen, unterscheidet sich deutlich von dem Profil, das für Modulatoren von Protein-Protein Wechselwirkung benötigt wird.

2.3.1.1 Enzyminhibitoren

C.A. Lipinski analysierte 1996 die Eigenschaften zahlreicher Wirkstoffe und stellte folgende Liste von Eigenschaften für Enzyminhibitoren auf (auch als „Pfizer Rules" bekannt)[55,56]:

1. Maximal 5 Wasserstoffbrückendonoren (Summe von OH und NH)
2. Maximal 10 Wasserstoffbrückenakzeptoren (Summe von N und O)
3. Molekulargewicht unter 500
4. Berechneter LogP (CLogP) unter 5
5. Ausnahmen stellen Verbindungen dar, die Substrate biologischer Transporter sind.

Diese Bedingungen resultieren aus Erfahrungswerten für Enzyminhibitoren, die in hohen Konzentrationen in der Zelle angereichert werden und am Besten zusätzlich noch stark an ihr Target binden sollten. Molekulargewicht und Zahl der Wasserstoffbrücken sind mit der Fähigkeit korreliert zum Zielort gelangen zu können. Der Verteilungskoeffizient LogP ist das Verhältnis der Gleichgewichtskonzentrationen einer Substanz in einer unpolaren Phase (meist 1-Octanol) und einer polaren Phase (meist Wasser). Die experimentelle Bestimmung ist theoretisch zwar einfach, praktisch jedoch oft mit Schwierigkeiten verbunden. Beim Design neuer Wirkstoffe am Computer entfällt diese Möglichkeit komplett. Um diese Probleme zu überwinden, wurden Verfahren entwickelt mittels einer Incrementen-Methode, die Log P Werte von Verbindungen zu berechnen. In der vorliegenden Arbeit wurde für diesen Zweck das für diese Zwecke gebräuchliche Programm CLogP[†] verwendet.[57-59] Wirkstoffe, die diesen Anforderungen entsprechen, sollten durch Diffusion in hohen Konzentrationen zu ihrem intrazellulären Wirkort gelangen und dort kompetitiv zu natürlichen Substraten auf Zielproteine wirken können.

2.3.1.2 Beeinflussung der Protein-Protein Wechselwirkung

Die durchschnittliche Oberfläche, die an einer Protein-Protein Bindung beteiligt ist beträgt 800 $Å^2$. Die Annahme, diese Wechselwirkung sei die Summe einer Vielzahl von schwachen Wechselwirkungen ist jedoch nicht korrekt, wie am Beispiel des Human Growth Hormon deutlich wird. Mutationsexperimente belegen, dass 8 der 31 beteiligten Aminosäuren für 85%

[†] Eine kostenlose Version ist unter www.daylight.com abrufbar.

der Bindungsenergie verantwortlich sind.[60,61] Bei stark assoziierenden Homodimeren finden sich an der Bindungsfläche eher unpolare Reste, die eine Dimerisierung begünstigen. Im Gegensatz dazu weisen Proteine, deren Assoziation und Dissoziation durch Umweltveränderungen beeinflusst wird, wie dies für die meisten signaltransduzierenden Proteine der Fall ist, eine schwächere Bindung und hydrophilere Reste an den Bindungsstellen auf. Bereits ein schwacher Ligand vermag Protein-Protein Wechselwirkungen signifikant zu beeinflussen.[62] Da Enzyminhibitoren oft kompetitiv zu natürlichen Substraten wirken sollen, die oft in hohen intrazellulären Konzentrationen vorliegen, ist eine hohe effektive Konzentration der Inhibitoren in der Zelle erforderlich. Diese Ansprüche sind daher auch auf die Leitstrukturen anzuwenden. Dem gegenüber stehen die Anforderungen für Wirkstoffe, die Protein-Protein Wechselwirkungen beeinflussen sollen. Hier gelten die von Lipiniski et al. vorgeschlagenen Einschränkungen nicht. Von größter Bedeutung ist es hier zunächst, die „Hot-Spots“ der Wechselwirkung zu identifizieren. Die Bioverfügbarkeit und intrazelluläre Konzentration ist von untergeordneter Bedeutung, da die Konzentration der an Signalkaskaden beteiligten Enzyme deutlich geringer ist als z.B. für ATP als Substrat einer Kinase. Die Entwicklung eines Wirkstoffes, der eine Protein-Protein Wechselwirkung beeinflusst, erfordert also einen Paradigmenwechsel weg von den Lipinski-Regeln[63]. Diese geänderten Anforderungen erlauben auch etwas mehr peptidischen Charakter der Verbindungen. Beleg für diese Tatsache ist der, wenn auch vergleichsweise kleine, Markt für peptidische Wirkstoffe.[64] Neben den bereits kommerziellen Somatostatin Analoga und ACE Inhibitoren befindet sich ein Peptid (Betabloc® von Elan) zur Behandlung der Alzheimerschen Krankheit in fortgeschrittenen klinischen Phasen. Hier steht die Inhibition der Aggregation der β-Amyloid-Peptide im Fokus.[64]

2.3.2 Strategien zur Leitstrukturentwicklung

2.3.2.1 Naturstoffe als biologisch validierte Startpunkte

In den letzten Jahren wurden wiederholt Naturstoffe mit interessantem Aktivitätsspektrum und ebenso faszinierender Struktur aus den unterschiedlichsten Organismen isoliert. Die Organismen aus denen diese Substanzen gewonnen wurden, betreiben die teilweise recht aufwendige Biosynthese gewiss nicht zum Selbstzweck, sondern verwenden diese Verbindungen als Teil einer Strategie zur Verteidigung ihres Lebensraumes. Im Laufe der Evolution konnten diese Verbindungen im Hinblick auf eine bestimmte Aktivität hin optimiert werden. Generell kann man daher Naturstoffe als biologisch validierte Startpunkte im Strukturraum betrachten. Den in den letzen Jahren unternommenen Anstrengungen, mit Hilfe einer großen Zahl von Verbindungen und High-Throughput-Screening neue Wirkstoffe zu entdecken, waren prozentual nur geringe Erfolge beschieden. Möglicherweise deckten die Substanzbibliotheken der Pharmaunternehmen biologisch nicht relevante Bereiche im Strukturraum ab. Niedermolekulare Naturstoffe als Startpunkte einer Leitstruktur- bzw.

Wirkstoffsuche für Enzyminhibitoren zu betrachten erscheint daher als eine vielversprechende Strategie.

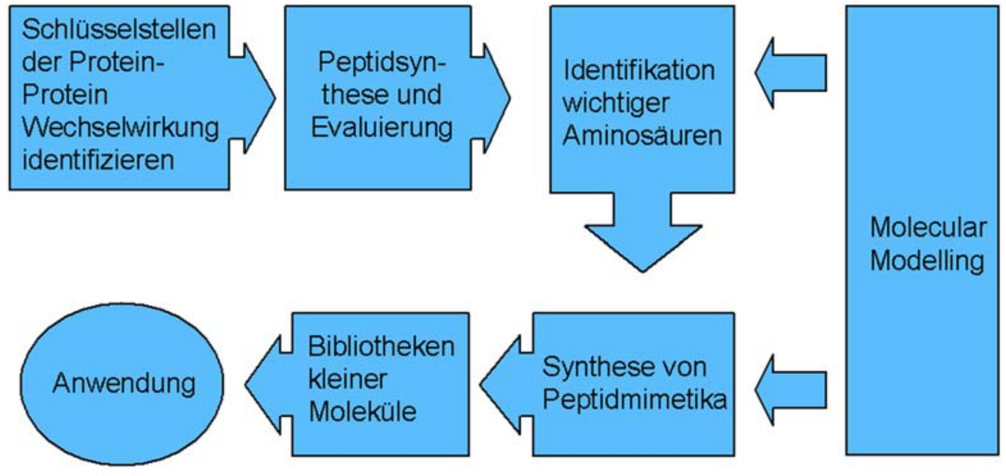


Abbildung 12: Strategie zur Entwicklung und Optimierung einer Leitstruktur wenn ein Rückgriff auf einen bereits validierten Startpunkt nicht möglich ist.

2.3.2.2 Verwendung von Peptiden als Sonden für die Leitstrukturentwicklung

In Abwesenheit eines bereits validierten Startpunktes bedarf es jedoch eines anderen Ansatzes, um aus der unendlichen Zahl denkbarer Strukturen solche zu identifizieren, die der Lösung der gestellten Aufgabe zuträglich sind. Aufgrund ihrer Vielfalt im Bezug auf funktionelle Gruppen und in Anbetracht der in Abschnitt 2.3.1.1 erwähnten Eigenschaftsprofile sind Peptide als Sonden für eine solche Leitstruktursuche geradezu prädestiniert. Wie erfolgreich dieser Ansatz sein kann wird durch zahlreiche Literaturbeispiele belegt. Über Peptide und Peptidomimetika sind beispielsweise Inhibitoren der SH2 Domäne zugänglich.[65] Auch der Rezeptor für den Komplementfaktor C5a konnte mit einem zyklischen Peptid inhibiert werden, das als Vorstufe eines Entzündungshemmers evaluiert wird.[66] Die im Laufe der weiteren Entwicklung gesuchten Peptidomimetika müssen nicht nur die geeigneten funktionellen Gruppen tragen, sondern auch die Strukturen der Peptide (Helix, Faltblatt, β-Turns) imitieren. Hierfür sind ebenfalls einige vielversprechende Systeme entwickelt worden.[4]

2.3.3 Methoden zur Leitstrukturentwicklung

Der Ansatz, mit chemischen Liganden die Rolle einzelner Gene bzw. der codierten Proteine aufzuklären und durch gezielte Beeinflussung Therapien gegen Krankheiten zu entwickeln, wird abwechselnd mit „biologischer Chemie“ oder „chemischer Biologie“ bezeichnet. Die hierzu equivalenten Begriffe „Chemical Genetics“ oder „Chemical Genomics“ deuten die Absichten etwas besser an.[67] Das Syntheserepertoire an Methoden wurde in den letzten Jahren durch zunehmend verfeinerte computer-gestützte Verfahren ergänzt. Beide Ansätze finden in der vorliegenden Arbeit Anwendung.

2.3.3.1 Chemische Verfahren: Festphasensynthese von Peptiden

Wie in Abbildung 12 aufgezeigt, spielen Peptide nicht nur bei der Partial- oder Totalsynthese biologischer Strukturen eine Rolle.[68] Auch zur Identifikation für die Wechselwirkung mit dem Target wichtiger funktioneller Gruppen sind Peptide ein wertvolles Werkzeug. Die durch Reinigungs- und Löslichkeitsprobleme erschwerte Lösungssynthese von Peptiden wird seit den revolutionären Arbeiten von B. Merryfield[69-71] in zunehmendem Maße durch Festphasensynthese ersetzt. Den Problemen der Racemisierung, sowie sinkender Ausbeuten bei Kupplung anspruchsvoller Aminosäuren, konnte in den letzten Jahren durch die Entwicklung hochleistungsfähiger Kupplungsreagentien begegnet werden.[72] Auch ohne die hochtoxischen und cancerogenen BOP Reagentien können N-terminal geschützte Aminosäuren mit HOBt und HBTU voraktiviert und in hohen Ausbeuten auf die wachsende Kette aufgekuppelt werden. Die Strukturen, der in dieser Arbeit verwendeten Reagentien und Linker, sind aus Gründen der Übersichtlichkeit im Anhang II wiedergegeben. Steht hierbei keine einzelne Zielsubstanz sondern maximal Diversität als Ziel fest, so können in dem von K.S. Lam und K. Furka entwickelten Split-and-Mix[73] Verfahren rasch große Zahlen von Verbindungen synthetisiert werden. Durch die Anwendung orthogonaler Schutzgruppen ist eine schrittweise Entschützung der Aminosäureseitenketten und letzlich die Abspaltung der Zielpeptide vom Harz möglich. Die Verfahrenweise in der kombinatorischen Chemie besteht aus drei Schritten: 1) der Synthese der Bibliothek 2) dem Screening der Verbindungen bezüglich einer bestimmten Aktivität 3) die Aufklärung der Struktur der aktiven Verbindungen. Das Screening kann direkt am Harz („on-bead screening“) oder in Lösung durchgeführt werden. Die Strukturaufklärung ergibt sich bei einer kombinatorischen Parallelsynthese aus der Abfolge der Bausteine. Bei der Synthese einer kombinatorischen Split-Mix-Bibliothek ist die Auswahl einer Encoding Methode notwendig, da die räumliche Trennung von Einzelverbindungen nicht mehr möglich ist. Ein „graphisches“ Encoding erfordert die Beschriftung z. B. von Tea-Bags. Ein „chemisches“ Encoding, meist durch DNA Sequenzen, die nach PCR Amplifizierung analysiert werden, erfordert die parallele Synthese zweier Verbindungen pro Bead. „Elektronisches“ Encoding kann nur mit aufwendigen Apparaturen (IRORI System) durchgeführt werden.[74] Bei der Synthese von Peptid-Split-Mix Bibliotheken bietet sich die Sequenzierung durch Edman-Abbau an, da dieses Verfahren gut etabliert ist. Gängige automatisierte Systeme können selbst wenige Femtomol eines Peptids auf einem Bead sicher analysieren.

2.3.3.2 Computer-gestützte Verfahren: Molecular Modelling

In der modernen biologischen Chemie haben rechnergestützte Methoden mittlerweile einen festen Platz neben biologischen und chemischen Verfahren erobert. Molecular Modelling ist a priori keine Computerwissenschaft, jedoch wäre die von einem einfachen Protein verursachte Datenflut sicher nicht ohne schnelle Prozessoren zu bewältigen. Unter dem Überbegriff sind solche Methoden gesammelt, die es erlauben, dreidimensionale Strukturen von kleinen

Molekülen und Proteinen zu berechnen sowie die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Liganden zu analysieren. Die Quantifizierung der Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor stellt die größte Herausforderung auf dem Gebiet des Molecular Modelling dar. Zahlreiche Ansätze für die hier benötigten „Scoring Functions" sind bereits veröffentlicht. Einige sind in kommerziellen Programmen integriert und erlauben eine vom Nutzer unabhängige (aber auch nicht beeinfluss- und korrigierbare!) Bewertung von Wechselwirkungen.[75]

2.3.3.2.1 Kraftfelder und Semi-empirische Verfahren

Wenngleich sich die Rechnerleistung gemäß Moore's Law[76] immer noch regelmäßig verdoppelt, ist die ab-initio Betrachtung ganzer Proteine (noch) nicht praktikabel. Für die Berechnungen in dieser Arbeit wurde daher ausschließlich auf semi-empirische Methoden und Kraftfeldrechnungen zurückgegriffen. Semi-empirische Verfahren erreichen die Beschleunigung der Rechnung durch mehrere Vereinfachungen im Vergleich zu ab-initio Verfahren. Zum einen werden einige der zu lösenden Integrale ignoriert und durch dem Experiment angepasste Parameter substituiert. Zum anderen werden lediglich die Valenzelektronen in die Rechnung einbezogen, basierend auf der Annahme diese seien hauptsächlich für die molekularen Eigenschaften verantwortlich. In der vorliegenden Arbeit wurden die semiempirischen Berechnungen mit dem AM1 Algorithmus durchgeführt.[77] Da signifikante Abweichungen zu den Resultaten der Kraftfeldrechnungen nicht auftraten, wurden die meisten Berechnungen jedoch mit letzterer Methode durchgeführt. Im Gegensatz zu quantenmechanischen Verfahren werden bei Kraftfeldrechnungen Kerne und Elektronen ignoriert und die Atome statt dessen als miteinander wechselwirkende Massepunkte betrachtet. In Analogie zu makroskopischen Systemen stellen die Atome elastische Kugeln dar, die durch Federn verschiedener Stärke miteinander verbunden sind. Den verschiedenen Atom- und Bindungstypen wird durch Parametrisierung verschiedener Atomtypen Rechnung getragen. Damit kann die potentielle Energie eines Moleküls berechnet werden, die sich aus verschiedenen Energien zusammensetzt.

$$E_{tot} = E_{str} + E_{bend} + E_{tors} + E_{vdW} + E_{elec} + \ldots$$

Neben reinen Schwingungs- oder van der Waals-Termen werden auch Cross-Terme z.B. für Drehschwingungen berechnet. Grundgedanke ist, dass Abweichungen von Idealwerten im Aufbau von Spannungsenergien resultieren. Kraftfeldprogramme versuchen daher eine Funktion für die Gesamtenergie zu minimieren und alle Bindungen den Idealwerten anzunähern. Eine weitere implizite Annahme ist die Übertragbarkeit von experimentellen Bindungsparametern auf andere Moleküle. Da sich jedoch z.B. nicht alle Sauerstoffatome in ähnlichen Umgebungen befinden, sind für CHARMM Rechnungen alleine hierfür mehr als 20 Parametersätze für verschiedene Umgebungen definiert. CHARMM (*Chemistry at **Ha**rvard **M**olecular **M**echanics*) ist ein von M. Karplus et al. entwickeltes Kraftfeldeprogramm.[78,79] In gleicher Weise wird unterschiedlichen Hybridisierungen oder Bindungsordnungen durch

Parametrisierung weitere Atomtypen Rechnung getragen. Die Minimierung der Gesamtenergiefunktion erfolgt nach verschiedenen Methoden, wobei die zwei Folgenden am gebräuchlichsten sind.

a) Steepest Descent: Bei dieser Methode wird die erste Ableitung der Energiefunktion berechnet, nachdem jeweils ein Atom aus der Ursprungsposition verschoben wurde. Anhand der ersten Ableitung legt das Programm die weitere Richtung und die Distanzen fest, über die die Atome in einem Schritt bewegt werden. Diese Methode eignet sich für die anfängliche Korrektur einer „groben“ Struktur. In der Nähe des Energieminimums sind die Rechnungen jedoch sehr langsam.

b) Conjugate Gradient: Bei dieser Methode werden die Informationen über die Minimierungsschritte gesammelt um die Umkehr vom zuvor gemachten Fortschritt zu verhindern. Dieser Extra-Aufwand vergrößert zwar Rechenzeit und Speicherbedarf, liefert aber im Bereich eines Minimums eine rasche Konvergenz. Daneben gibt es zahlreiche Modifikationen dieser Methode, die aber in der vorliegenden Arbeit keine Anwendung fanden.

Bei Kraftfeldrechnungen werden Moleküle normalerweise im "Vakuum" betrachtet, d. h. es gilt $e = 1$. Für den Fall unpolarer Kohlenwasserstoffe ist der Fehler hierbei vernachlässigbar. Geladene oder polarisierte Moleküle können jedoch nicht so einfach behandelt werden. Das Ignorieren von Solvenzeffekten würde zu einer starken Überbewertung von elektrostatischen Interaktionen führen. Neben der Definition einer korrigierten Dielektizitätskonstante oder dem Hinzurechnen von Lösungsmittelmolekülen gibt es auch Ansätze die Solvatation in die Parametrisierung einzubeziehen. PEP (s.u.) verwendet ein solches „Implicit-Solvation Model“.[80]

2.3.3.2.2 Homology Modelling

Zur Betrachtung von Proteinen mittels Molecular Modelling sind dreimensionale Informationen unerlässlich. Fehlen Strukturinformationen aus Kristallen oder entsprechen diese aufgrund kristallographischer Besonderheiten (z.B. Packungseffekte) nicht der nativen Struktur, kommen Verfahren zur Berechnung dieser Strukturen zum Einsatz. Der wissensbasierte Ansatz, auch Homology Modelling genannt, gründet auf der vergleichbaren Faltung sequenzhomologer Proteine. Der Prozess besteht aus mehreren Einzelschritten. Ausgehend von der Primärsequenz des Zielproteins müssen homologe Proteine gesucht werden. Ihre bekannte dreimensionale Struktur soll als Templat dienen. Je höher der Grad der Homologie, desto zuverlässiger ist das Homologiemodell. Für diesen Arbeitsschritt gibt es mittlerweile zahlreiche Programme. Für die vorliegende Arbeit wurde die Software BLAST [81] verwendet, die über das Internet Datenbanken wie die SwissProt Database nach Proteinen durchsucht, die zu einer vorgegebenen Sequenz homolog sind. Die Primärsequenz des Zielproteins wird durch Vergleich mit der Templatsequenz in strukturell konservierte Regionen (SCR) und strukturell variable Regionen (SVR) unterteilt. Die Sequenzen werden so aneinander angepasst, dass SCRs parallel liegen und innerhalb der SVRs möglichst viele Aminosäuren homolog sind. Während BLAST und ähnliche Programme primär nach SCRs

suchen, erlauben Programme wie DIALIGN[82] auch die korrekte Anordnung von Aminosäuren innerhalb der SVRs. Verwendet werden hierfür mathematische Such-Methoden, wie das Hidden-Markov-Modell.[83] Schwierigkeiten bereiten insbesondere die unter Umständen unterschiedliche Länge homologer Regionen. Auch in der vorliegenden Arbeit traten diese Schwierigkeiten auf, so dass auch hier eine manuelle Feinabstimmung der Aminosäureanordnung unerlässlich war. Die Aminosäuren des Zielstruktur werden auf Basis dieser Vorgabe an die Templatstruktur angepasst. MODELLER[84] ist ein Programm zur Erstellung von Homologiemodellen auf Basis einer Templatstruktur und den parallel angeordneten Primärsequenzen. Die Konformation der Aminosäuren wird durch ein Verfahren ermittelt, in dem die Einhaltung räumlicher Beschränkungen („Restraints) (vorgegebenen Positionen der SCRs und sterische Limitationen) optimiert wird. Nächster Schritt ist die Positionierung der Seitenketten. Aus der großen Zahl denkbarer Rotationsisomere müssen hierbei die realistischen identifiziert werden. Eine vollständige Lösung diese Gleichungssystems ist mit heutigen Computern nicht realisierbar, da theoretisch ein Rotamer einer Aminosäure konstant gehalten und sämtliche Rotamere der anderen Aminosäuren permutiert werden müssten. Das Programm MODELLER greift hier zunächst auf die in einer Datenbank gespeicherten, statistisch am häufigsten auftretenden Konformationen zurück. In späteren Phasen der Berechnungen, wird ausgehend von dieser Konformation eine Geometrieoptimierung unter Beachtung der lokalen Umgebung durchgeführt. Dies geschieht durch eine Kombination von Kraftfeldrechnung (CHARMM Parameter) und Molecular Dynamics (Simulated Annealing). Die Bewertung der Güte eines solchen Homologiemodells erfolgt z.B. mittels WHATCHECK. Dieses Programm stellt eine Sammlung von Berechnungsroutinen dar, die die Qualität einer 3D Struktur beurteilen. Aus der Analyse von Bindungs- und Torsionswinkeln, der Verteilung hydrophober Aminosäuren zwischen dem Inneren des Proteins und der Oberfläche sowie der Überprüfung interatomarer Abstände kann auf die Qualität des Modells geschlossen werden. An das Hinzufügen von Wasserstoffatomen und essentiellen Metallionen schließt sich der letzte Schritt des Homology Modelling an, die strukturelle Verfeinerung der Struktur mittels Energieminimierung. Bedingt durch die Zahl von Atomen in vielen Proteinen, kommen hierfür nahezu ausschließlich Kraftfeldrechnungen in Frage. Zu den leistungsstarken, vielseitigen und ständig aktualisierten Programmen gehört das von M. Karplus et al. konzipierte CHARMM (siehe Abschnitt 2.3.3.2.1).[78,79]

2.3.3.2.3 Docking

Zur Vorhersage der gebundenen Konformationen werden vermehrt automatische Docking Programme wie GOLD verwendet.[85,86] Hierbei werden verschiedene, mögliche Konformationen der Liganden an einen Rezeptor gedockt und ihre Bindungsaffinität ermittelt. Die Oberfläche des Rezeptors wird nach Art der potentiellen Interaktionsstellen charakterisiert. Anschließend sucht das Programm eine Position des Liganden bei der möglichst viele Interaktionsstellen mit passenden Stellen auf der Ligandenoberfläche interagieren. Zur

Quantifizierung bedarf es einer sog. “Scoring Function”. Leider können die gängigen Programme die Flexibilität des Rezeptors nicht berücksichtigen.[‡]

2.3.3.2.4 De-Novo Design von Liganden

Das de-novo Design von Liganden für einen vorgegebenen Rezeptor kann manuell im Sketch-Modus von Programmen wie InsightII oder WitnotP erfolgen oder automatisch mit PEP oder LUDI. PEP ist ein Programm für struktur-basierendes Docking und das Design von peptidischen Liganden. Die Konstruktion der Software erlaubt es auch, selbst nicht-natürliche Aminosäuren oder andere Fragmente in die Fragment Bibliothek einzutragen. PEP baut die Liganden in einem iterativen Verfahren ausgehend von einem „Seed“ auf. Bei jeder Stufe wird die Geometrie des neuen Monomers optimiert. Beim Design eines Liganden ist die Zahl der Variablen recht groß, da man gleichzeitig im Sequenz- oder Konstitutionsraum und dem Konformationsraum suchen muss. Programme wie LUDI, PRO_LIGAND oder GROW schränken daher oft die Zahl der Konformationen auf solche ein, die in Kristallstrukturen gefunden wurden. Dadurch könnten unter Umständen vorteilhafte Konformationen eines neuen Liganden unberücksichtigt bleiben. PEP unterwirft sich diesen Einschränkungen nicht. Eine Bewertung sämtlicher möglicher Konformationen ist ab einer gewissen Ligandengröße nicht mehr möglich. Ein systematisches Durchsuchen des Konformationsraumes ist sehr zeitraubend, da die Rechenzeit mit zunehmender Zahl drehbarer Bindungen stark ansteigt. Ein Ansatz um möglichst viele Lösungen des Problems mathematisch zu evaluieren sind genetische Algorithmen[87]. Sowohl PEP als auch GOLD bedienen sich zur Ermittlung optimaler Geometrien eines sogenannten genetischen Algorithmus. In Analogie zum natürlichen Vorbild, wird jeder Geometrie des evaluierten Liganden ein Chromosom zugeordnet. Diese werden durch Mutations- und Cross-Over-Operatoren verändert und erneut evaluiert. Chromosomen mit einer höheren Fitness ersetzen die Chromosomen der Eltern-Generation. Durch ihre stochastische Natur gibt es bei genetischen Algorithmen eine endliche Wahrscheinlichkeit die optimale Lösung nicht zu finden. Allerdings ist ihre Effektivität als Such- bzw. Optimierungsalgorithmen mehrfach nachgewiesen.[88] Die Chromosomen in GOLD oder PEP enthalten Informationen über Wasserstoffbrücken zum Rezeptor, hydrophobe Wechselwirkungen und die potentielle Energie der gewählten Konformationen. PEP erlaubt keine weiteren manuellen Änderungen. GOLD ermöglicht beispielsweise Veränderungen in der Zahl der Chromosomen oder des Selektionsdrucks, was sich primär auf die Rechenzeit auswirkt.

2.3.3.3 Auswahl von Einflussfaktoren

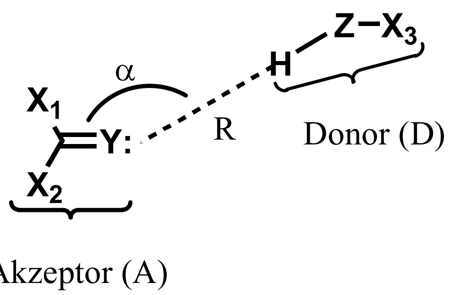
Bei der Untersuchung der Bindung von Liganden an einen Rezeptor müssen einige wichtige Wechselwirkungsarten berücksichtigt und korrekt gewichtet werden.

---

‡ Einschränkungen und Probleme von GOLD wurden bereits ausführlich evaluiert. Die Resultate können unter http://www.ccdc.cam.ac.uk/prods/gold/ccdc_test.html eingesehen werden.

2.3.3.3.1 Wasserstoffbrückenbindungen

Die Wasserstoffbrücke ist die wichtigste orientierende zwischenmolekulare Wechselwirkungskraft in biologischen Systemen. Bei einer Wasserstoffbrücke handelt es sich um die Bindung eines kovalent gebundenen H-Atoms an ein zweites Atom. Brückenatome sind ausschließlich Wasserstoffe, weil diese die einzigartige Eigenschaft haben, bei physiologischem pH-Wert eine positive Teilladung zu tragen und doch noch kovalent gebunden vorliegen. Gleichzeitig ist das Wasserstoffatom klein genug, um eine relativ enge Bindung an ein zweites elektronegatives Atom zu erlauben. Die biologisch relevanten, schwachen Wasserstoffbrückenbindungen sind unsymmetrisch. Das H-Atom ist deutlich an einen der beiden Brückenköpfe gebunden.



Z = N, O, S

Y = O (Carbonyl, Ether, Alkohole)
N (Amine, Heterozyklen)
F

Abbildung 13: Zur Charakterisierung und Bewertung von Wasserstoffbrücken werden der Bindungsabstand R und der Winkel α herangezogen.[89]

Die Wechselwirkung ist primär elektrostatischer Natur und wird durch das Coulombsche Gesetz beschrieben, allerdings werden den Atomen hierbei keine ganzen, sondern Partialladungen zugeordnet.

2.3.3.3.2 Elektrostatische Wechselwirkungen

Aufgrund seiner hohen Dielektrizitätskonstante (ε = 78) schwächt Wasser elektrostatische Wechselwirkungen um einen Faktor von 78 gegenüber der gleichen Wechselwirkung im Vakuum. Dies kann bei Kraftfeldrechnungen, die gewöhnlich „im Vakuum“ durchgeführt werden zur Überbewertung dieser Wechselwirkung führen. Problematisch ist die Bewertung auch deshalb, da sich die Dielektizitätskonstante von der Protein-Oberfläche ins Innere des Proteins deutlich verändert. [90]

2.3.3.3.3 Hydrophobe Wechselwirkungen

Neben den Van-der-Waals-Wechselwirkungen zählen hierzu auch π-π-Stapel-Wechselwirkungen (π-stacking) und T-förmige edge-to-face Wechselwirkungen. Für die Bindung von Liganden an einen Rezeptor sind entropische und enthalpische Beiträge von besonderer Bedeutung, die oft als „Hydrophober Effekt“ zusammenfassend beschrieben werden. Zur Beschreibung des hydrophoben Effekts gibt es in der Literatur zwei Modelle, das Clathrat Käfig Modell und das Cavity-based Modell.[91] Demnach tragen zu diesem Effekt die besonderen Eigenschaften des Wassers, d.h. die kleine Molekülgröße oder besser die geringe

Größe der Zwischenräume zwischen Wassermolekülen sowie das geringe Ausdehnungsvermögen und die Struktur des Wassermoleküls mit einer tetraedrischen Anordnung von Wasserstoffbrückendonor und –akzeptorstellen bei.

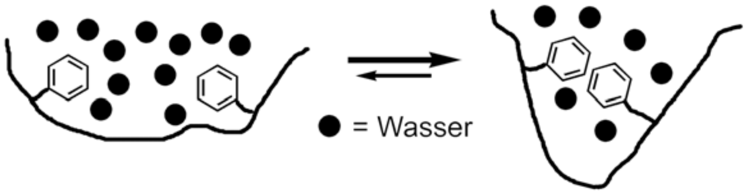


Abbildung 14: Schematische Darstellung des „hydrophoben Effektes“

Eine genaue Berechnung wird durch mehrere gegenläufige Effekte erschwert. Die Ausbildung eines Hohlraumes ist erschwert und trägt deutlich zum hydrophoben Effekt bei. Dies wird jedoch durch die Fähigkeit des Wassers abgeschwächt, einen Lösungsmittelkäfig um ein unpolares Molekül herum zu bilden ohne dabei zu viele Wasserstoffbrücken zu verlieren. Wie diverse Rechnungen und Experimente belegen, werden Wasserstoffbrückennetzwerke durch die Anwesenheit von Gastmolekülen sogar gestärkt.[90] Den Schwierigkeiten bei der Quantifizierung steht die experimentelle Erkenntnis gegenüber, dass das Verdrängen von Wassermolekülen aus einer hydrophoben Tasche einen erheblichen Gewinn von Bindungsenergie bedeutet und für die Affinität eines Liganden an einen Rezeptor ungleich wichtiger ist, als z.B. Wasserstoffbrücken. Letztere sind offenbar für die Orientierung eines Liganden in einer Bindungstasche von Bedeutung.[92]

2.3.3.3.4 Charakterisierung von Oberflächen und Taschen

Verlässt man sich nicht auf automatische Design Programme steht bei einer systematischen Vorgehensweise zunächst die Identifikation von geeigneten Interaktionspunkten zwischen Ligand und Protein (Bindungstaschen) im Vordergrund. Dies kann einerseits durch visuelle Inspektion der Strukturen an einer Workstation geschehen oder mit Computer Unterstützung. Für die Identifikation von Bindungstaschen sind Algorithmen wie PASS geeignet.[93]

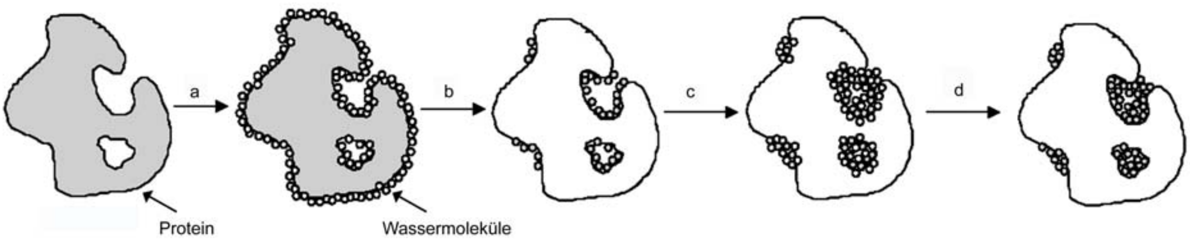


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Arbeitsweise von PASS, a) Beschichten der Oberfläche mit Wassermolekülen, b) Entfernen aller „solvent-accessible probes“ c) Beschichten der vorhandenen Moleküle mit einer weiteren Schicht aus Wassermolekülen d) Erneutes Entfernen des überschüssigen Wassermoleküle. Kann keine weitere Schicht aufgebracht werden, endet das Programm.

Der PASS Algorithmus füllt Taschen in einer Proteinstruktur mit kugelförmigen Sonden. An diese Sonden werden weitere angelagert. Diejenigen Sonden, die ein definiertes Limit für

Kontakte mit Lösungmittelmolekülen überschreiten, werden wieder entfernt. Dieser Prozess wird solange wiederholt bis alle neuen Sonden das Limit für Lösungsmittelkontakte überschreiten. Die verbleibenden Sonden füllen die Taschen komplett aus und werden als Atomkoordinaten in einer PDB Datei ausgegeben.

Die Notwendigkeit zu diesen Untersuchungen entfällt, wenn aufgrund kinetischer Studien beispielsweise eine Bindung in einem bekannten aktiven Zentrum nachgewiesen werden konnte. Für die Arbeiten mit Analoga der Naturstoffe Nakijichinon C und Pepticinnamin E (Kapitel 4.2 und 4.3) ist Letzteres der Fall. Eine Kristallstruktur eines Enzym/Ligand Komplexes ist als Beweis optimal geeignet, allerdings eher selten vorhanden. Wie zuvor beschrieben spielen Wasserstoffbrücken als orientierende Wechselwirkungen und hydrophobe Interaktionen bei der Stärke von Wechselwirkungen eine besondere Rolle. Welche Ligandengruppen nun für die Wechselwirkung geeignet sind lässt sich durch eine Untersuchung derjenigen Aminosäuren klären, die eine Tasche des Proteins begrenzen.

Für eine orientierende Analyse eines Proteins ebenfalls geeignet ist das Programm HYDROMAP, das die Berechnung der Hydrophobizitätskarte eines Proteins gestattet und dies auf einer „Solvent Accessible Surface" graphischen darstellt.[94] Hydrophobizität wird als ein sehr wichtiger Faktor bei der molekularen Erkennung und Bindung von Liganden betrachtet. Hydrophobizitätskarten sind graphische Darstellungen der Bindungsenergie einer unpolaren, kugelförmigen Sonde, die über die Proteinoberfläche gerollt wird. Diese Bindungsenergie beinhaltet neben einem elektrostatischen Anteil auch hydrophobe Wechselwirkungen. Letztere werden im Programm HYDROMAP über die Gleichung für van-der-Waals Wechselwirkungen berechnet.

3. Ziele der Arbeit

Aufgabe der Naturwissenschaft ist es nicht nur, die Erfahrungen zu erweitern, sondern in diese Erfahrungen eine Ordnung zu bringen. Niels Bohr

Die zuvor skizzierten zellulären Vorgänge verlangen zweifelsohne eine weitere Aufklärung und sind für die Anwendung von Methoden der biologischen Chemie (Chemical Genetics) ideal geeignet. Das Verständnis von Signaltransduktionsprozessen kann sehr gut mittels selektiver Inhibitoren für an diesen Prozessen beteiligte Enzyme erweitert werden. Neben der Entwicklung von Werkzeugen zum Studium zellulärer Prozesse sollten dabei auch die Grundlagen für die Entwicklung von Wirkstoffen für die Signaltransduktionstherapie gelegt werden. In den vier Teilprojekten dieser Arbeit sollten die Erkenntnisse auf dem Gebiet der Signaltransduktion erweitert und im Bohr'schen Sinne auch rationalisiert werden. Für die einzelnen Projekte sollen daher neben chemischen Methoden auch Rechner-gestützte Verfahren zur Erreichung der folgenden Ziele verwendet werden:

3.1 GTPase Aktivatoren

Ein potentieller Angriffspunkt der Signaltransduktionstherapie ist die „Switch-Off“ Reaktion des Ras Proteins. Während für die Entwicklung von Wirkstoffen und Werkzeugen bei den unter in Kapitel 4.2 und 4.3 beschriebenen Projekten Naturstoffe als biologisch validierte Startpunkte bekannt sind, muss bei der Entwicklung eines Ras-GTPase Aktivators eine Leitstruktur erst entwickelt werden. Gemäß der in Abbildung 12 gezeigten Vorgehensweise zur Identifikation der Schlüsselstellen auf der Proteinoberfläche sollen hierfür Peptide als Sonden zum Einsatz kommen.[63,95] Auf dieser Stufe sind Molecular Modelling Arbeiten zur Unterstützung und Beschleunigung einzusetzen. Durch die Verwendung von Methoden der kombinatorischen Chemie, ergänzt durch Molecular Modelling Studien soll somit eine erste Leitstruktur für ein Ras-GAP ersetzendes kleines Molekül ermittelt werden. Der primäre Fokus dieses Projektes soll zunächst die Affinität des Moleküls zu Ras im Bereich der GTP-Bindungstasche sein. Daneben sollen in Zusammenarbeit mit der Abteilung von Prof. Dr. Wittinghofer am MPI in Dortmund exploratorische Versuche zur GTP Hydrolyse durchgeführt werden.

3.2 Rezeptor-Tyrosin-Kinase Inhibitoren

Um das Verständnis für die Wirkung und insbesondere für die Selektivität des Naturstoffs Nakijichinon und dessen Analoga auf Rezeptor-Tyrosin-Kinasen auf molekularer Ebene zu erweitern, sollte aufbauend auf den synthetischen Arbeiten von Dr. Petra Stahl aufgeklärt werden, wie diese Verbindungen mit den Kinasedomänen der untersuchten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wechselwirken. Neben den dreidimensionalen Strukturen der Liganden, werden hierfür die Strukturen der Kinasedomänen benötigt. Fehlende Kristallstrukturen sollen hier durch die Konstruktion von Homologiemodellen der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Tie-2, VEGFR-2, VEGFR-3 und erbB-2 ersetzt werden. Diese sollten anschließend zur Aufklärung der Bindungsmodi der Nakijichinon-Analoga eingesetzt werden, die mit den vorhandenen Struktur-Aktivitäts Daten in Einklang zu bringen sind. Darüber hinaus soll die Grundlage für die Entwicklung optimierter synthetisch gut zugänglicher Kinaseinhibitoren geschaffen werden, was in Anbetracht der in Abbildung 1 gezeigten Erfolgsquote auf diesem Gebiet ein wichtiges Ziel darstellt.

3.3 Farnesyltransferase Inhibitoren

Unter Verwendung der bekannten Kristallstrukturen der Ras-Farnesyltransferase sollten mittels Molecular Modelling die Bindungsmodi für den Naturstoff Pepticinammin E sowie einige der von Dr. Michael Thutewohl synthetisierten Inhibitoren ermittelt werden. Hierbei sollten auch die experimentell bestimmten Aktivitätsunterschiede rationalisiert werden. Darüberhinaus sollten Pepticinammin E Analoga der zweiten Generation entworfen und hinsichtlich der Aktivität und Selektivität bezüglich der Farnesyltransferase oder der Geranylgeranyltransferasen I und II optimiert werden.

4. Spezieller Teil

4.1 Entwicklung einer Leitstruktur zur Verbesserung der intrinsischen GTPase Aktivität von Ras-Mutanten

Holzhacken ist deshalb so beliebt, weil man bei dieser Tätigkeit den Erfolg sofort sieht.

Albert Einstein

4.1.1 Vorüberlegungen

Das Fehlen eines biologisch validierten Startpunktes für dieses Projekt führte zur Anwendung der in Abbildung 12 (Abschnitt 2.3.2.1) illustrierten Strategie. Die eingangs erwähnten Arbeiten von A. Wittinghofer et al.[43] lieferten zwar die Idee, dass eine Restoration der GTPase-Aktivität von Ras-Mutanten durch kleine Moleküle möglich sein könnte, aber auch die Erkenntnis, dass das eingesetzte 3,4-Diaminobenzophenon jedoch leider nicht als Leitstruktur verstanden werden kann. Verwendete man beispielsweise zur Entwicklung einer Leitstruktur nach der genannten Strategie die kommerziell erhältlichen 42 Fmoc-(S)-Aminosäuren[§] und synthetisiert Pentapeptide, würde dies die Synthese und Evaluierung von 130,691,232 Verbindungen notwendig machen. Einschränkungen sind daher ebenso erforderlich wie auch die Etablierung einer effizienten Synthese sowie entsprechend leistungsfähiger Evaluierungsmethoden. Die Untersuchung des Target Proteins mittels Computer-gestützter Methoden wurde daher bereits in der ersten Phase des Projektes durchgeführt, um erste Einschränkungen bei der Wahl der Aminosäuren zu erlauben. Aufgrund der dennoch zu erwartenden großen Zahl von Zielsequenzen schied eine Lösungssynthese der Peptide als Option aus.

4.1.2 Molecular Modelling Analyse der potentiellen Bindungsstelle

Da wegen einer fehlenden Leitstruktur oder anderen Informationen zu positiven Bindungseinflüssen zunächst keine a priori Einschränkungen bei der Wahl von Strukturelementen gemacht werden konnten, sollte zunächst versucht werden, mittels Molecular Modelling die Zahl der Zielverbindungen einzuschränken. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung am Computer musste eine geeignete 3D Struktur des Ras-Proteins ausgewählt werden. Wenngleich mehrere Kristallstrukturen von menschlichen Ras-Proteinen bekannt sind,[40,96,97] gelang bislang nur die Kristallisation eines C-terminal verkürzten Proteins. Da aber die C-terminalen Reste nicht in der Nähe der GTP-Bindungstasche liegen, ist die Verwendung der Kristallstrukturen der verkürzten Ras-Proteine (Aminosäuren 1-166) keine Quelle eines systematischen Fehlers. Durch Überlagerung verschiedener Ras-Kristallstrukturen war eine Struktur zugänglich, die dem Ras*GTP Enzym-Substrat Komplex

[§] Die Zahl bezieht sich auf den Katalog der Firma Novabiochem 2002.

entspricht (siehe Experimenteller Teil). Für alle folgenden Berechnungen diente diese G12V-Ras-Struktur als Grundlage.

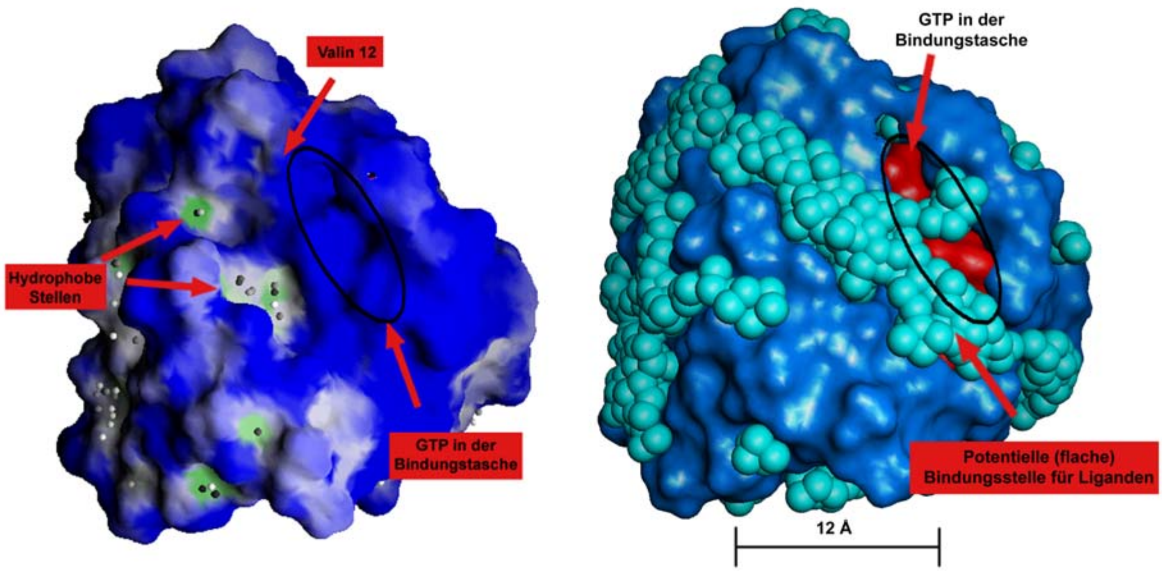


Abbildung 16: Die Hydrophobizitätskarte des Ras-GTP Komplexes (links, siehe auch Experimenteller Teil): Blaue Bereiche kennzeichnen hydrophile Regionen, von Grau bis Grün nimmt der hydrophobe Charakter zu. Die GTP-Bindungstasche ist durch ein schwarzes Oval markiert. GTP wurde für die Berechnung der Oberfläche in die Struktur eingeschlossen. Die für eine Bindung interessanten Stellen sind durch Pfeile markiert. Daneben ist das Resultat der Suche nach geeigneten Bindungstasche gezeigt (siehe AAV-MM21). Die Oberfläche des GTP Moleküls ist rot eingefärbt.

Zunächst wurde die in Abbildung 16 gezeigte Hydrophobizitätskarte des Ras-GTP Komplexes erstellt, um mögliche Bindungstaschen zu charakterisieren. Parallel wurde mittels des PASS-Algorithmus nach geeigneten Bindungstaschen für Liganden gesucht. Aus Abbildung 16 ist ersichtlich, dass im relevanten Bereich der Ras-Oberfläche (in der Nähe der GTP-Bindungstasche) keine tiefe hydrophobe Tasche zu finden ist, die eine starke Affinität eines Liganden bedingen könnte. In der markierten flachen Kerbe finden sich jedoch hydrophobe Stellen, die unpolare Wechselwirkungen mit einem Liganden eingehen könnten.

4.1.2.1 Berechnungen mit PEP 1.0

Um die große Zahl der möglichen peptidischen Liganden vor der Synthese sinnvoll zu reduzieren, wurde mit dem Programm PEP (Peptide Engineering Program) ein *in silico screening* einer kombinatorischen Peptid-Bibliothek durchgeführt. Die Verwendung von Peptiden als Sonden für geeignete Kombinationen von Funktionalitäten bzw. hydrophoben Resten sowie deren geometrische Anordnung kann nur dann optimal funktionieren, wenn ein möglichst großer Bereich des Funktionalitäts-/Strukturraumes erreichbar ist. In der von Prof. Caflisch bereitgestellten Version von PEP waren nur (S)-Aminosäuren in der Monomer-Bibliothek enthalten.[80] Der Algorithmus des Programmes erlaubt jedoch auch den Einsatz von (R)-Aminosäuren als Monomere, sowie die Verknüpfung nicht peptidischer Fragmente. Daher

wurde die Monomer-Bibliothek, die mit PEP 1.0 geliefert wurde, erweitert (AAV-MM17). Neben den bereits vorhandenen 20 natürlichen Aminosäuren wurden die D-Enantiomere sowie einige nicht-natürliche Aminosäuren hinzugefügt. Da die Position des „Seeds“ (d.h. der ersten Aminosäure) einen erheblichen Einfluss auf das Resultat der Berechnungen haben kann,[80] wurden mehrere Runs jeweils mit verschiedenen Seed Positionen und unterschiedlichen Seed-Aminosäuren durchgeführt. Einerseits wurde Glycin an verschiedenen Stellen der flachen Bindungskerbe als Startpunkt platziert, andererseits diente das Arginin 789 des GAP-Proteins aus der Struktur des Ras-GAP Komplexes als Vorlage. Es ist eng an die Phosphatgruppen des GTP sowie Reste in der Switch II Region koordiniert und hat im Sinne der angestrebten Hydrolyse eine bevorzugte Position inne. Die bei diesen Runs wiederholt als bevorzugt erscheinenden Aminosäuren wurden für die Synthese einer ersten Peptidbibliothek ausgewählt. Hierzu gehören Glycin, Phenylalanin, Glutamin, Asparagin, Serin, Asparaginsäure und Tyrosin. Die dabei generierten Daten sind auf der beiliegenden CD im Verzeichnis „pep“ gespeichert. Die ausgewählten Sequenzen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

BFFF	OFFF	UFFF	ZFFF	JFFF	BANRG
JANRG	BGNRG	JGNRG	BFNRG	BAYFG	JAYFG
ZAYFG	BNYFG	JNYFG	ZNYFG	BADFG	JADFG
ZADFG	BNDFG	JNDFG	ZNDFG	ZSQRG	ZYQRG
BGNFG	BFNFG	BGDFG	BFDFG	BANFG	JFNRG
XFAFG	OFNFG	UYQRG	OFNRG	OSQRG	UGDFG

Tabelle 1: Mitglieder der ersten Peptidbibliothek (siehe auch Abbildung 17)

4.1.3 Synthese einer kleinen Peptid-Bibliothek

4.1.3.1 Auswahl der Kopfgruppen

γ-Phosphatgruppen von Nucleosidtriphosphaten werden in biologischen Systemen entweder auf Serin, Threonin, Tyrosin oder Wasser übertragen. Um die Spaltung der Phosphorsäureanhydrid Bindung zwischen dem β und γ Phosphat von GTP zu bewirken, muss die entstehende Ladung gemäß den eingangs diskutierten Erkenntnissen über den Mechanismus kompensiert werden. In der Vergangenheit wurden zahlreiche Strukturen, wie Diamine, Diole, Polyamine sowohl aliphatischer als auch aromatischer Natur als Bestandteile synthetischer Phosphatasen und Phosphodiesterasen evaluiert.[98],[99]Auf Basis dieser Vorbilder wurden die in Abbildung 17 gezeigten Strukturen als „Kopfgruppen“ ausgewählt. Diese sollten als voraktivierte Säuren auf den freien N-terminus der Peptide an der festen Phase gekuppelt werden.

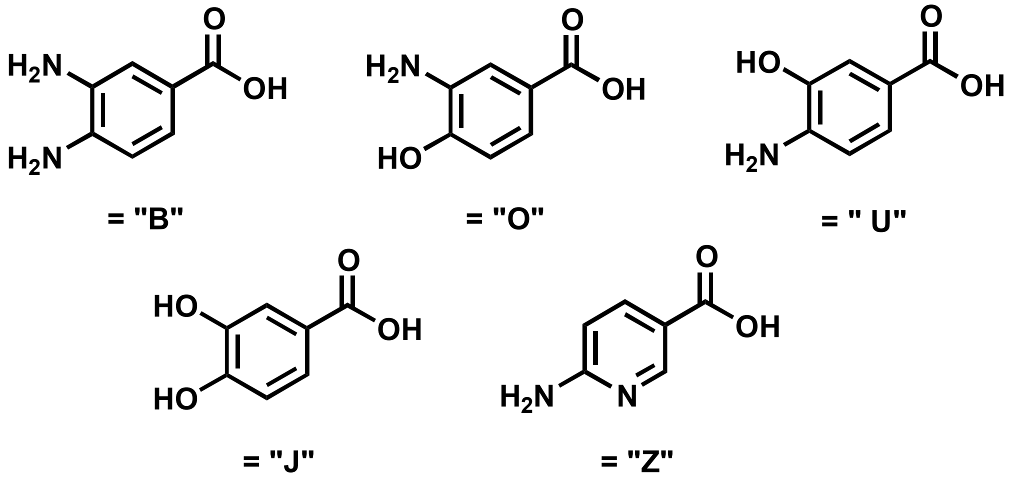


Abbildung 17: Kopfgruppen für die Peptidbibliothek. Zur Vereinfachung der Nomenklatur sind den einzelnen Resten Buchstaben für den Ein-Buchstaben-Code zugeordnet. (siehe auch Tabelle 1)

Auf Basis der PEP Berechnungen wurden die in Tabelle 1 gezeigten Sequenzen für eine erste kleine Bibliothek von Peptiden mit verschiedenen Kopfgruppen ausgewählt und synthetisiert. Die nachfolgende biologische Evaluierung hinsichtlich einer Beschleunigung der GTP Hydrolyse durch G12V Ras wurde von Herrn Dipl. Biol. Robert Gail durchgeführt.[**]

4.1.3.2 Synthese der Kopfgruppen

Der Synthese der Peptide aus Tabelle 1 wurde die Synthese von Testverbindungen vorangestellt. In Lösung wurden die Kopfgruppen an L-Phenylalaninmethylester oder aliphatische Amine und bei Versuchen an der festen Phase an ein Phe-Phe-Phe Peptid auf Wang-PS-Harz gekuppelt. Zunächst sollte 3,4-Diaminobenzoesäure N-terminal an Peptide gekuppelt werden. Die Reaktivität der meta-Aminogruppe machte die Einführung einer Schutzgruppe erforderlich. Sowohl Versuche zur Acylierung als auch die Versuche verschiedene Urethanschutzgruppen einzuführen, resultierten jeweils in schwer trennbaren Produktgemischen mit geringem Anteil des gewünschten Produkts. Die Reaktivität der *para*-Aminogruppe entspricht der eines Amides, was gemäß dem Vinylogie-Prinzip nicht überraschend ist. Umgekehrt erklärt dies auch die schlechte Reaktivität der Carbonylgruppe bei Kupplungen, wie in Vergleichsversuchen mit 4-Aminobenzoesäure festgestellt wurde. Die Maskierung der Aminogruppen als Nitrogruppen und die Kupplungen der Peptide mit 3,4-Dinitrobenzoesäure brachten schließlich den Erfolg. Die Absenkung der Energien der π-Orbitale durch die Nitrogruppen und die damit verbundene geringere Elektronendichte am Carbonylkohlenstoffatom beschleunigen die Kupplungen mit 3,4-Dinitrobenzoesäure. Die anschließend erforderliche Reduktion der Nitrogruppen bedurfte zunächst einiger Optimierung, konnte aber letztlich auf zweierlei Weise bewerkstelligt werden. Idealerweise wurden für die Reaktionen an der festen Phase 20 Äquivalente einer 0,7 M Lösung von $SnCl_2$

[**] An dieser Stelle sei die fruchtbare Kooperation mit der Abteilung von Prof. Wittinghofer am MPI dankend erwähnt.

Dihydrat in DMF eingesetzt und überschüssiges Sn(II) durch Waschen mit DMF und DCM entfernt. Für Synthesen in Lösung war dies aufgrund der großen Mengen bei der Aufarbeitung entstehenden SnO_2 wenig geeignet. Statt dessen wurden die Nitrogruppen mit Nickel(II)borid reduziert.[100] Die Verwendung von Natriumdithionit und $FeSO_4$[101] ergab deutlich schlechtere Ausbeuten. Für die Kupplungen mit 3-Hydroxy, 4-Nitrobenzoesäure bzw. die 3-Nitro, 4-Hydroxybenzoesäure konnte die Reduktion mit $SnCl_2$ ebenfalls angewandt werden. Während anfänglich die phenolischen OH Gruppen beider Verbindungen durch Acylierung mit Phenylacetylchlorid oder Acetylchlorid geschützt wurden, zeigte sich im Laufe der Optimierung der Synthesen, dass ein Schützen dieser Funktionalität nicht erforderlich ist. Eine unbeabsichtigte Bildung eines Phenylesters mit einer durch HBTU/HOBt aktivierten Carbonsäure ist zwar möglich, der entstehende 5-Carboxy-2-nitro-phenylester ist jedoch ausreichend reaktiv, um mit einer freien Aminogruppe zu reagieren. Die HPLC Analyse der Testpeptide zeigte eine quantitative Umsetzung zum gewünschten Produkt. Es wurden keine Nebenprodukte detektiert.

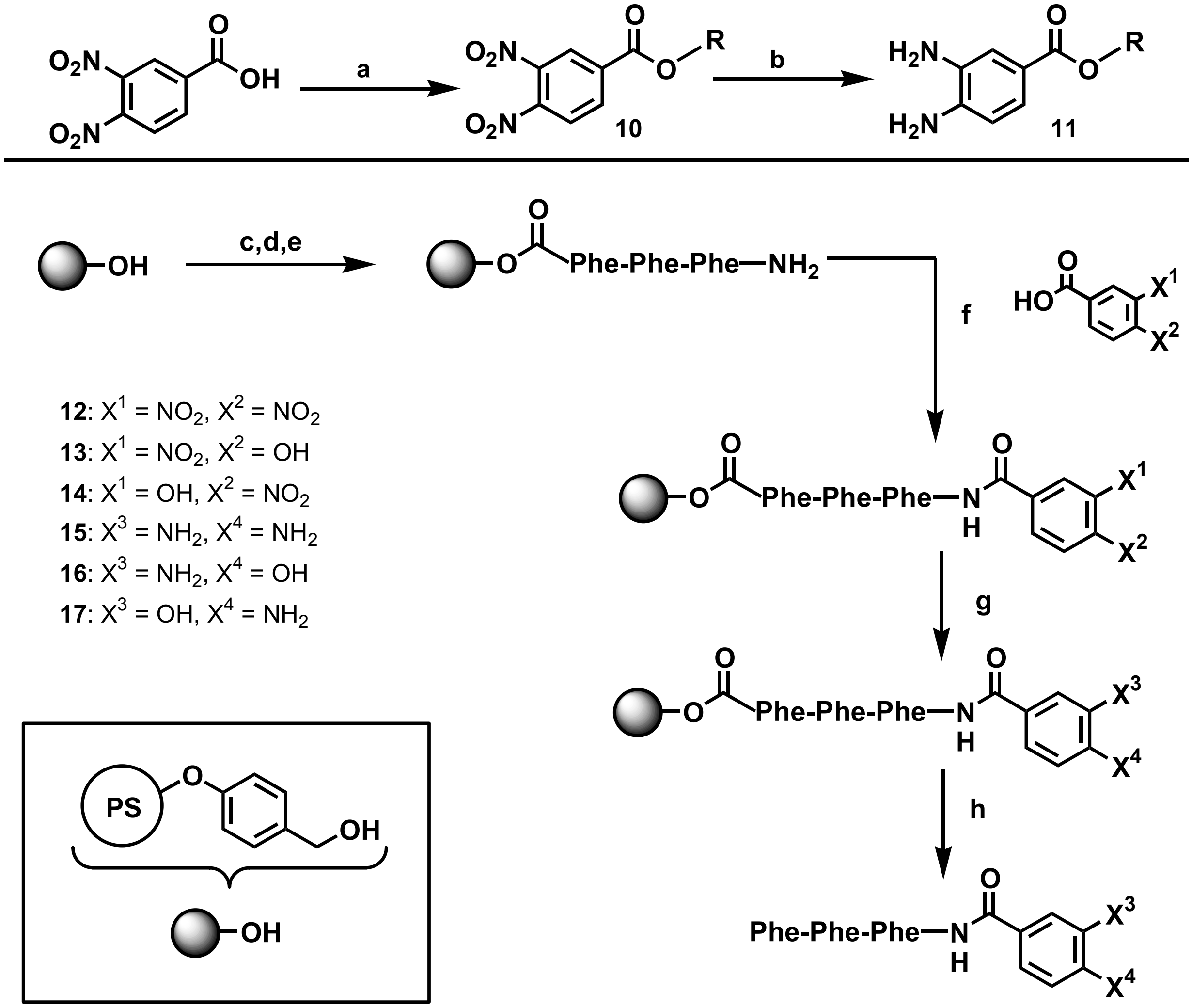


Abbildung 18: Synthese von Testverbindungen mit verschiedenen Kopfgruppen, a) HBTU, DIEA, DMF, *n*-Hexylamin, ($R=C_6H_{13}NH_2$) b) $SnCl_2$ x $2H_2O$, DMF c) Fmoc,Phe-OH, DIC, DMAP, d) 2 x Fmoc-Phe-OH, HBTU, DIEA e) Piperdin, DMF f) HBTU, DIEA g) $SnCl_2$ x $2H_2O$ h) TFA, CH_2Cl_2.

Die zur Guanidiniumgruppe isostere 6-Aminonicotinsäure sollte ebenfalls als Kopfgruppe verwendet werden, um Ladungen bei der GTP Hydrolyse kompensieren zu können. Für deren Einführung ist unter Anderem die Verwendung von 6-Chlornicotinsäure und nachfolgende Palladium-katalysierte Aminierung eine gängige Methode.[102] Der direkte Einsatz von 6-Aminonicotinsäure wäre zweifelsfrei eleganter und kürzer. Vorversuche zeigten, dass –I Effekte des Ringstickstoffes und der Carbonylgruppe die Reaktivität der primären Aminogruppe deutlich verringern. Die Einführung einer Schutzgruppe war damit nicht erforderlich. Problematisch im Bezug auf den Einsatz in der Festphasensynthese war die schlechte Löslichkeit von 6-Aminonicotinsäure in Dichlormethan, DMF oder NMP. Bei einer hohen Verdünnung ist unter Umständen mit einer Verlängerung der Reaktionszeiten und der möglichen Zunahme von Nebenreaktionen zu rechnen. Verschiedene Kupplungsmethoden wurden untersucht, wie die DIC oder EDC vermittelte Kupplung. Da keine Racemisierungsgefahr bestand, wurde anfänglich auf den Zusatz von HOBt verzichtet. Es zeigte sich jedoch schließlich, dass frisch zermörserte und im Feinvakuum getrocknete 6-Aminonicotinsäure in DMF durch Zugabe von fünf Äquivalenten DIPEA und je einem Äquivalent HBTU und HOBt bei einer Konzentration von 0.07 mol/l gelöst werden und direkt auf ein Peptid gekuppelt werden konnte. Dies ist zu vergleichen mit einer Löslichkeit für die meisten Fmoc-Aminosäuren von 0.5 bis 1.0 mol/l DMF. Nach der Abspaltung vom Harz zeigte sich, dass dieser Kupplungsschritt nahezu quantitativ verlaufen war, da keine Abbruchsequenzen detektiert werden konnten.

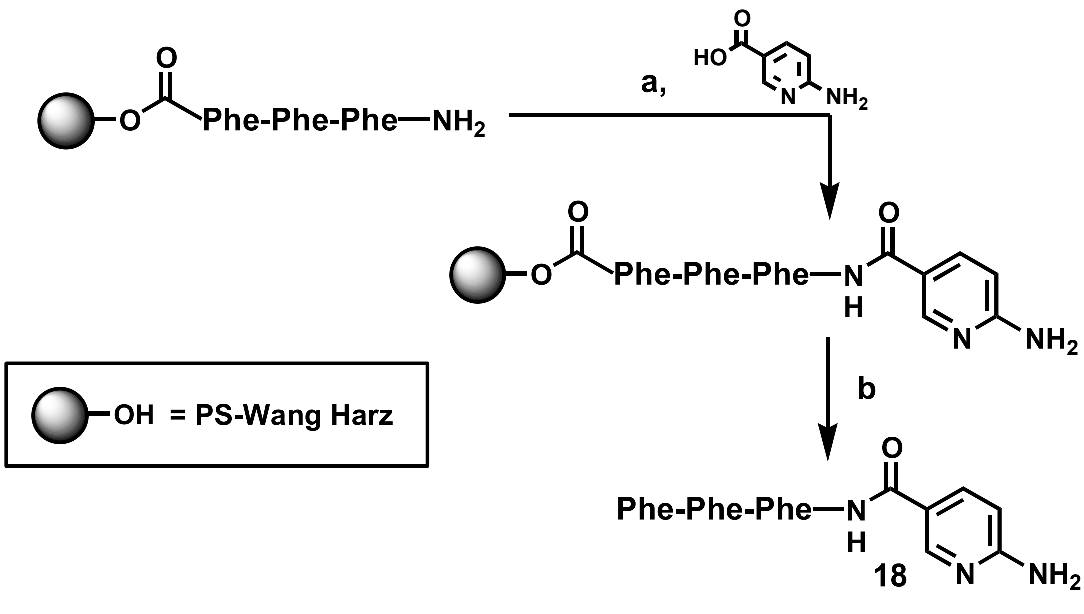


Abbildung 19: Synthese einer Testsequenz mit Aminonicotinsäure-Kopfgruppe, a) HBTU, DIEA, b) TFA, CH_2Cl_2.

Als fünfte Kopfgruppe sollte 3,4-Dihydroxybenzoesäure **19** verwendet werden. Da eine direkte Kupplung der ungeschützten 3,4-Dihydroxybenzoesäure an das jeweilige Peptid nicht zum Produkt führte oder mit schlechten Ausbeuten verlief, wurde eine geschützte Vorstufe verwendet. Orthogonal zum verwendeten säurelabilen Wang-Linker und den basenlabilen

Fmoc-Schutzgruppen für die Peptidsynthesen sind Pd(0) labile Schutzgruppen. Um ausgehend von 3,4-Dihydroxybenzoesäure die 3,4-Allyloxybenzoesäure **23** zu erhalten, war die Differzierung von phenolischen OHs und der Carbonsäuregruppe erforderlich. Einfacher und effizienter als die hierfür zunächst angewendete Veresterung mit Methanol/Thionylchlorid, ist die Umsetzung mit 5 eq. Allylbromid in Gegenwart von Cs_2CO_3 und K_2CO_3. Mit LiOH in Methanol/Wasser/THF kann anschließend der Allylester **22** selektiv und quantitativ verseift werden. Nach der Kupplung von **23** an ein festphasengebundenes Tripeptid konnten die Allylgruppen mit $Pd(Ph_3)_4$ und $PhSiH_3$ als Allylfänger abgespalten werden. Palladiumreste wurden mit einer Lösung von KCN in DMSO entfernt und das Peptid mit 95 % TFA in DCM vom Harz abgespalten.

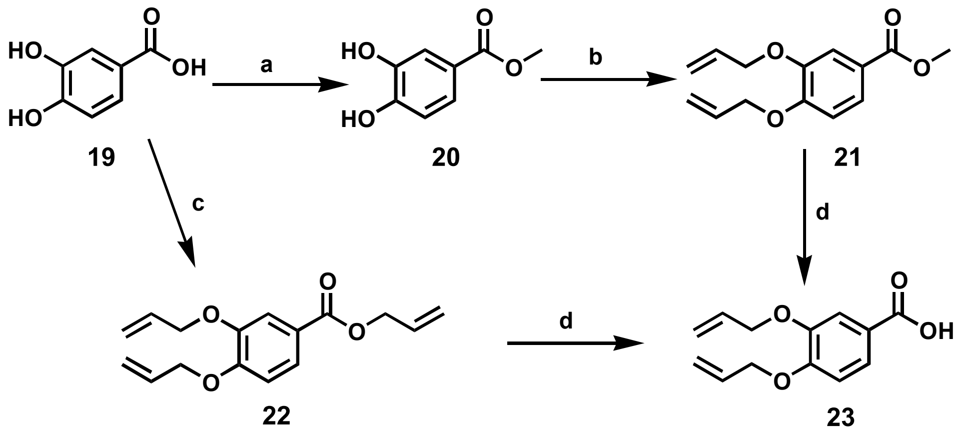


Abbildung 20: Synthese der DHBA Kopfgruppe: a) MeOH, $SOCl_2$, 98 % b) Allylbromid, K_2CO_3, THF, 86 % c) Allylbromid, K_2CO_3, Cs_2CO_3, THF, Rückfluss 98 % d) LiOH, MeOH, THF, H_2O > 99 %

4.1.3.3 Peptidsynthese

Der etablierte Zugang zu den fünf Kopfgruppen und die reproduzierbaren Kupplungen an Testpeptide erlaubten nun die Synthese einer kleinen Peptidbibliothek. Die Synthese der in Tabelle 1 gezeigten Sequenzen erfolgte unter Anwendung etablierter Verfahren auf Polystyrolharz, versehen mit einem säurelabilen Wang-Linker. Die Voraktivierung der Fmoc-geschützten Aminosäuren erfolgte mit HBTU/HOBt.[103] Die funktionellen Gruppen in den Seitenketten der Aminosäuren wurden mit säurelabilen Schutzgruppen versehen. Durch Asparaginsäure verursachte Nebenreaktionen lassen sich sehr gut durch den Einsatz des *tert*-Butylesters verhindern. Tyrosin, Serin und Glutamin wurden jeweils Trityl-geschützt verwendet. Von den zahlreichen Möglichkeiten für das Schützen der Guanidinofunktion des Arginins wurde die Pmc-Schutzgruppe ausgewählt, da diese weder aggressiver Abspaltungsbedingungen[104] bedarf, noch aus sterischen Gründen schlecht zu kuppeln ist, wie dies für Bis-Boc geschütztes Arginin beispielsweise der Fall ist.[105] Die säurelabilen Schutzgruppen sollten bei der Abspaltung des Peptides von der festen Phase gleichzeitig entfernt werden. Da die Quelleigenschaften des Harzes sich im Laufe der Synthese deutlich verändern[106,107] war es von Vorteil, zunächst in reinem Dichlormethan und nach Anknüpfung der zweiten Aminosäure in einem 1:1 Gemisch von Dichlormethan und DMF zu arbeiten. Für

die manuelle Parallel-Synthese der einzelnen Peptide wurden jeweils 100 mg Wang-Harz verwendet. Nach der Aufreinigung mittels präparativer HPLC zeigte sich bei der Lagerung der Produkte bei –30 °C, dass insbesondere die Peptide mit der Diaminobenzoesäure-Kopfgruppe zur Zersetzung neigten. HPLC-ESI-MS Untersuchungen ergaben Hinweise auf eine langsame Oxidation der aromatischen Aminogruppen.

4.1.3.4 Biologische Evaluierung

Die durch präparative HPLC gereinigten Peptide wurden von Dipl. Biol. Robert Gail getestet. Hierzu wurden zwei Assays verwendet. Zunächst wurde in einem Filterbindungstest RasG12V*GTP beladen. Das verwendete GTP war am γ-Phosphat mit ^{32}P markiert. Das durch einen Hydrolyse-Aktivator freigesetzte radioaktive P_i, bindet jedoch nicht an den Cellulosefilter. Die Detektion von Radioaktivität erlaubt Rückschlüsse auf die Hydrolyse von GTP. Daneben wurde in einem Fluoreszenz-Polarisation-Assay die Bindung von Alexa488-RafRBD[††] an RasG12V*GTP gemessen. Die freie Ras-Bindungs-Domäne (RBD) hat eine hohe Beweglichkeit. Bindung an RasG12V*GTP senkt die Beweglichkeit und erhöht die gemessene Polarisation. Da RafRBD nur an Ras bindet, wenn GTP gebunden ist, kann hier gemessen werden, ob die Hydrolyse von Ras-GTP durch die Testsubstanzen beschleunigt wurde. Leider bewirkte keines der getesteten Peptide eine Beschleunigung der GTP Hydrolyse durch G12V-Ras im ersten Assay. Dieses Resultat wurde durch den zweiten Assay bestätigt. Da weder fehlende hydrolytische Aktivität der Kopfgruppen noch eine zu geringe Affinität zu Ras als Ursachen ausgeschlossen werden konnten, sollten nun über eine neue Synthesestrategie Peptide synthetisiert und in einem neu zu entwickelnden Assay zunächst nur hinsichtlich ihrer Affinität zu Ras evaluiert werden.

4.1.4 Synthese einer Split-Mix-Bibliothek und Aufbau eines High-Throughput-Assays

4.1.4.1 Vorüberlegungen

Anstelle einer Einzelsynthese und –evaluierung von Verbindungen sollte durch die Synthese einer Split-Mix-Bibliothek, bestehend aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Lysin, Alanin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Isoleucin und Glycin eine große Zahl von Peptiden synthetisiert und gescreent werden. Hydrophobe aromatische und aliphatische Aminosäuren sowie positiv und negativ geladene Reste werden hier ergänzt durch Prolin und Glycin, die die Zahl der zugänglichen Konformationen beeinflussen. Damit ist ein breites Spektrum möglicher Interaktionen mit dem Rezeptor abgedeckt. Für die Split-Mix-Synthese von Pentapeptiden ergeben sich daraus 32768 verschiedene Sequenzen. Diese Zahl schließt die

[††] RafRBD ist die **R**as **B**inding **D**omain des Raf Proteins. Diese wurde hier mit dem Farbstoff Alexa 488 gelabelt.

Isolierung und Einzelcharakterisierung aller Peptide und damit die Anwendung des von Dipl. Biol. R. Gail entwickelten Fluoreszenz Assays mit Alexa488 markiertem RafRBD aus. Neben den Synthesen war daher ein neuer Assay zu etablieren. Der von M. Marshall et al. erbrachte Nachweis, dass von Raf abgeleitete Peptide an Ras binden können, bestätigt den Ansatz dieses Projektes.[108] Gleichzeitig ist dies jedoch Hinweis darauf, dass selbst ein von Hydrolyse unabhängiger Affinitäts-Assay die Peptide, die in der Nähe von GTP binden, nicht von solchen Peptiden unterscheiden kann, die in einer anderen flachen Kerbe auf der Ras-Oberfläche binden. Die von Marshall et al. synthetisierten Peptide binden offenbar nicht in der GTP Bindungstasche. Es musste daher sichergestellt werden, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierten Liganden an der richtigen Stelle der Proteinoberfläche binden.

4.1.4.2 Verwendung von GTP als Anker

Das Fehlen einer ausgeprägten tiefen Bindungstasche erschwert es, die Bindung von möglicherweise schwach affinen Liganden an der richtigen Stelle der Proteinoberfläche sicherzustellen. Der Weg, schwach bindende Liganden zunächst durch kovalente Verknüpfung mit dem Rezeptor zu selektieren, wurde bereits von S.L. Schreiber et al. erfolgreich beschritten, wobei er diese Verknüpfung treffend als „biasing element“ bezeichnete.[109,110] In der Arbeit von S. L. Schreiber bildeten Thiolgruppen in den Liganden zu einem oberflächlichen Cystein eine Disulfidbrücke aus und stellten so die Bindung an der gewünschten Stelle der Proteinoberfläche sicher. Hierfür ist jedoch eine Proteinmutante erforderlich, die an der entsprechenden Stelle der Oberfläche ein Cystein trägt. Einfacher und eleganter ist im hier betrachteten Fall die Verwendung von GTP selbst als Anker für solche Peptide, wobei die Verknüpfung über einen Spacer geschehen sollte. In diesem Sinne wäre GTP ein „Supramolecular Biasing Element“. Anstelle des Spacers kann später eine Hydrolyse-stimulierende Kopfgruppe eingeführt werden. Durch die Anknüpfung der Peptide an GTP ist zwar keine kovalente Bindung an Ras gegeben, die picomolare Affinität von GTP an Ras sichert jedoch eine ausreichend starke Wechselwirkung und garantiert, dass die GTP-Peptidkonjugate nur im Bereich der GTP Bindungstasche binden. Während bei der ersten Bibliothek die Affinität der Peptide selbst die Messgröße war, ist hier der Referenzpunkt die Affinität von GTP bzw. DABP-GTP **7** zu Ras. Die reduzierte Affinität von DABP-GTP **7** ist auf den störenden Einfluss der Substitution am γ-Phosphat zurückzuführen. Bindet ein GTP-Peptid-Konjugat nun stärker an Ras, so dürfte dies auf einen positiven Beitrag des peptidischen Teils zurückzuführen sein und Rückschlüsse auf Peptidsequenzen erlauben, die eine Affinität in der Nähe der GTP Bindungstasche vermitteln.

4.1.4.3 Design der Split-Mix Bibliothek

Die gewählte Methode zur Bestimmung der Struktur der aktiven Bestandteile einer Split-Mix-Bibliothek (Encoding)[74] bestimmt neben der N-terminalen Verknüpfung der Peptide mit GTP

auch den Aufbau der Bibliothek. Anstelle des apparativ sehr aufwendigen „Electronic Encoding“ (z. B. IRORI) oder „graphical Encoding“[111] wurde ein „chemical Encoding“ ausgewählt. Im vorliegenden Fall sollte eine Affinität der Marker zu Ras a priori ausgeschlossen werden. Da die Präsenz einer zweiten Verbindung, wie z.B. codierende DNA Sequenzen oder andere Peptide[99] auf einem Bead möglicherweise die Aussage eines Bindungsassays beeinflusst hätte fiel die Wahl daher auf die Edman Sequenzierung zur Analyse der aktiven Verbindungen. Da hierzu ein freier *N*-Terminus einer Peptidkette erforderlich ist, sollte daher bei der Kupplung der letzten Aminosäure eine 9:1 Mischung von Fmoc- und Boc-geschützter Aminosäure eingesetzt werden. Die Fmoc-Aminosäuren können nach der Entschützung mit dem Spacer und GTP gekuppelt werden. Die Boc-geschützte Sequenz erlaubt später die Durchführung der Sequenzierung.

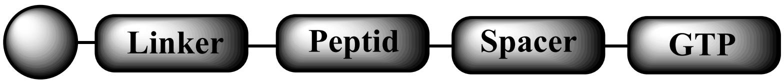


Abbildung 21: Aufbau der Zielverbindungen an der festen Phase.

Die allgemeine Struktur der Bibliothek ist in Abbildung 21 schematisch dargestellt. Ein Linker zum Harz ist für die Validierung der Chemie erforderlich. Da die Einzelüberprüfung aller Beads nicht möglich ist, muss die Leistungsfähigkeit der chemischen Methoden vor der Synthese der Bibliothek gesichert sein. Ansonsten besteht die Gefahr, in einem Assay nur solche Beads zu überprüfen, bei denen die chemischen Transformationen einwandfrei funktioniert haben. Neben der Synthese geeigneter Spacer und Linker mussten daher nun Methoden zur Synthese und Analyse von GTP und GTP Konjugaten an der festen Phase etabliert werden.

4.1.4.4 Synthese von Triphosphat-Konjugaten

Die von A. Wittinghofer et al. verwendeten „caged“ GTP-Analoga, aus deren Reihen auch das DABP-GTP stammt, wurden durch Umsetzung eines großen Überschusses des Amins mit dem aus GTP, durch Aktivierung mit EDC, synthetisierten Trimetaphosphat in wässrigem Puffer hergestellt.[112,113] Diese Methode weist einige schwerwiegende Nachteile auf. So findet bei der Umsetzung mit wasserunlöslichen Aminen keine Reaktion statt, die Ausbeuten, bezogen auf das nicht gerade preiswerte GTP, sind mit 10 % für chemische Synthesen nicht akzeptabel und die Reinigung erfordert eine langwierige Ionen-Austausch-Chromatographie, um nicht umgesetztes GTP abzutrennen, so dass die Synthese auf sehr stabile Verbindungen beschränkt ist. Bei der Anknüpfung zuvor synthetisierter Peptide ist die Verwendung eines Überschusses wenig ratsam, beim Einsatz von einem Äquivalent GTP sinkt die Ausbeute auf unter 2 %.

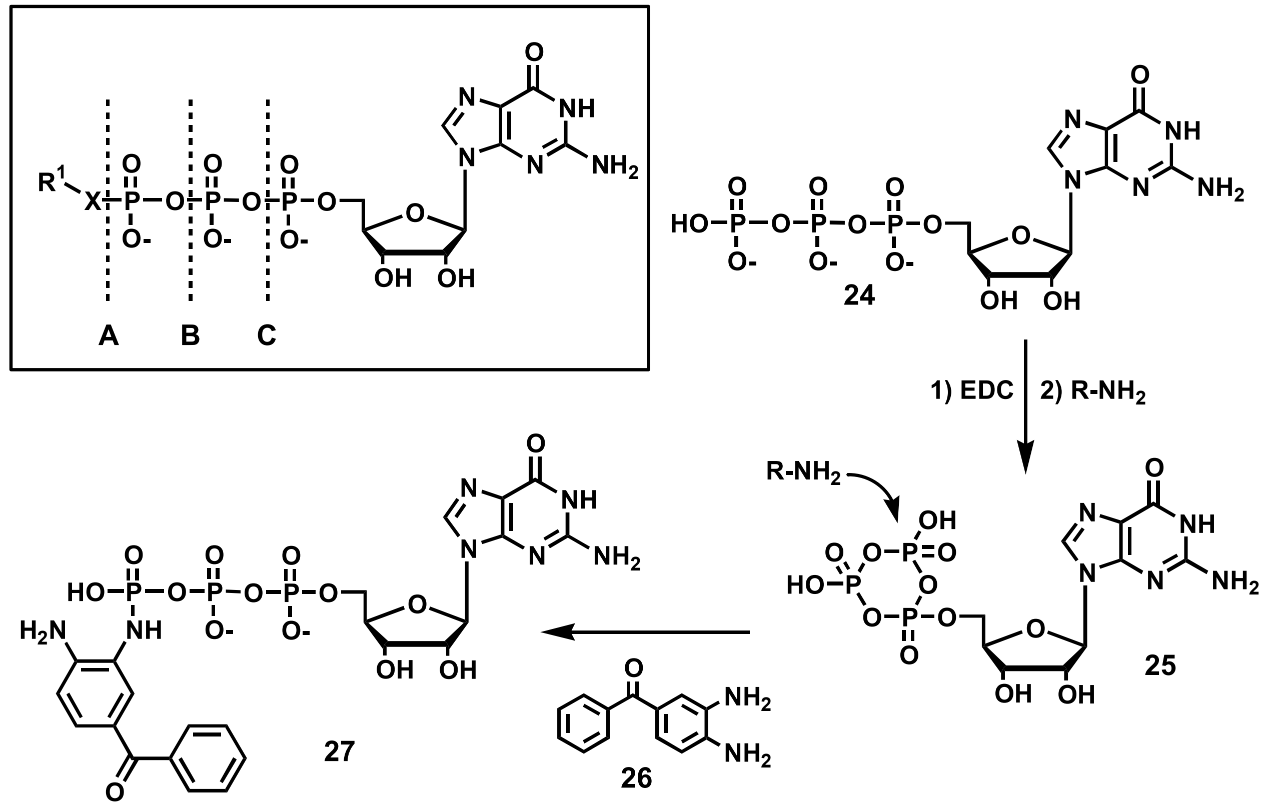


Abbildung 22: a) Retrosynthese von GTP-Analoga b) Synthesestrategie nach Morr et al.

Neben dieser Vorgehensweise, die dem in Abbildung 22 angedeuteten Retrosyntheseschnitt „A“ entspricht, ist der Aufbau von GTP-Konjugaten auch aus GDP (Schnitt „B“) oder GMP (Schnitt „C“) Vorläufern möglich. Ein sukzessiver Aufbau ausgehend vom Nucleosid über wiederholte Phosphorylierung mit $POCl_3$ wurde ebenfalls bereits erprobt.[114] Eleganter ist die Aktivierung von GDP mittels Carbonyl-diimidazol (CDI) und Kupplung mit einem Phosphat (Schnitt „B“).[115,116‡‡]

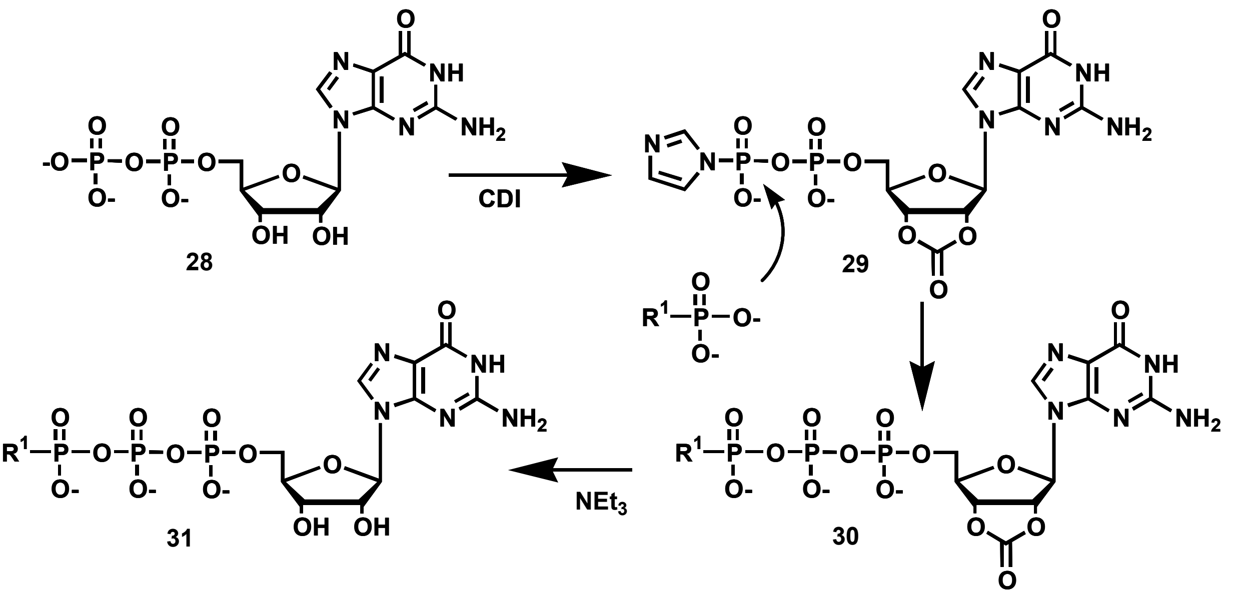


Abbildung 23: Neue Synthese von GTP-Analoga

‡‡ Der durch „C“ markierte Schnitt könnte möglicherweise in zukünftigen Projektstufen verfolgt werden, z.B. für die Synthese hydrolysestabiler GppNHp-Analoga.

Aus dieser Wahl der Verknüpfungsmethode folgt zwingend die allgemeine Struktur der Spacer, die über eine Säurefunktion mit dem N-terminus des Peptides gekuppelt werden sollten und gleichzeitig über eine Phosphatgruppe die Reaktion mit aktiviertem GDP ermöglichen sollten.

4.1.4.5 Auswahl und Synthese der Spacer

Abgesehen von der Möglichkeit, den Spacer in hohen Ausbeuten an das Peptid zu kuppeln, sollte eine gewisse Flexibilität des Spacers den Einfluss auf die Bindungskonformation der Peptide minimieren. Der Spacer sollte des Weiteren durch eine Distanz von mindestens 4 C-C Bindungen zwischen γ-Phosphat und Peptid der Rolle als Platzhalter für die später einzuführenden hydrolyseaktiven Gruppen gerecht werden. Verschiedene Spacer Geometrien sollten darüber hinaus unterschiedliche Positionen der Peptide an der Ras-Oberfläche ermöglichen. Da die hier unerwünschte Hydrolyse von GTP durch Ras im Falle von 3,4-Diaminobenzophenon-GTP durch den aromatischen Ring gestört wurde, sollten neben flexiblen aliphatischen Strukturen auch substituierte Aromaten als Spacer eingesetzt werden. Spacer wie **32** erlauben darüber hinaus aufgrund der Ähnlichkeit einen direkten Vergleich zu DABP-GTP.

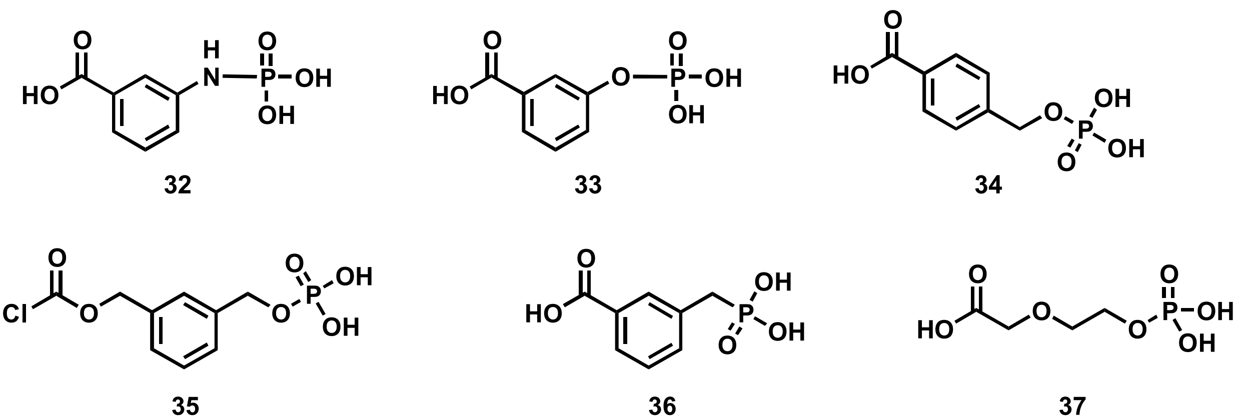


Abbildung 24: Untersuchte Spacer zwischen Peptid und GTP

4.1.4.6 Synthesen der Spacer

4.1.4.6.1 3-Phosphorylaminobenzoesäure

Analog zur literaturbekannten Synthese von N-Phosphoryl Aminosäuren[117] sollte der Spacer **32** ausgehend von 3-Aminobenzoesäure synthetisiert werden. Da diese Experimente wenig erfreulich verliefen, wurde in Anlehnung an die in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen Erfahrungen, 3-Nitrobenzoesäure **38** als Edukt eingesetzt. Die Veresterung von **38** verlief mit 80 % zufriedenstellend. Bei der nachfolgenden Reduktion waren die Ausbeuten bei Verwendung von H_2 und Pd/C besser als bei Reduktion mit $SnCl_2$ in DMF. Der Phosphorylierung von **40** mit Diallylphosphochloridat wurde hier der Vorzug vor der

Standard „Phosphoramidit-Chemie“ gegeben, da eine Umamidierung am Phosphat als wenig aussichtsreich einzustufen war.[118] In der Tat konnte die Verbindung **41** in 56 % Ausbeute isoliert werden. Bei der nachfolgenden Entschützung des TMS-Ethylesters führten jedoch alle Verfahren (TBAF in DMF oder DMSO[119], KF in Wasser/DMF, oder TBACl[120]) zu kompletter Zersetzung des Eduktes, so dass eine Revision der Schutzgruppenstrategie erforderlich wurde.

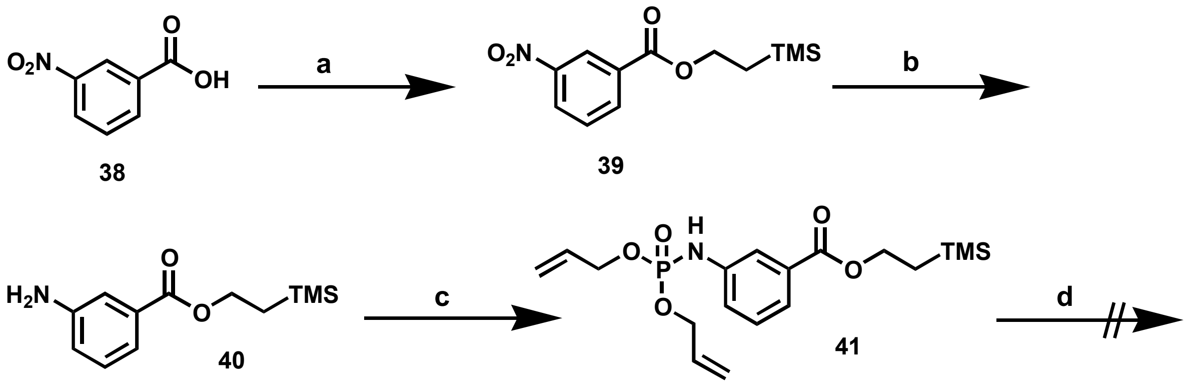


Abbildung 25: Synthese des Spacers 32, a) TMS-CH$_2$-CH$_2$-OH, HBTU, DIEA b) H$_2$, Pd/C, Methanol c) (AllylO)$_2$POCl

Die Wahl des Fluorenylmethylesters wurde aufgrund der Möglichkeit einer sehr milden Abspaltung getroffen. Nach der DCC/DMAP[121] vermittelten Veresterung von **38** konnte durch Reduktion mit $SnCl_2$ aus **42** in 76 % Ausbeute das Anilin **43** erhalten werden. Aufgrund der durch die erneute Zersetzung des Eduktes **44** bei der Abspaltung des Fluorenylmethylesters belegten Basenlabilität wurden nun säurelabile Schutzgruppen eingesetzt.

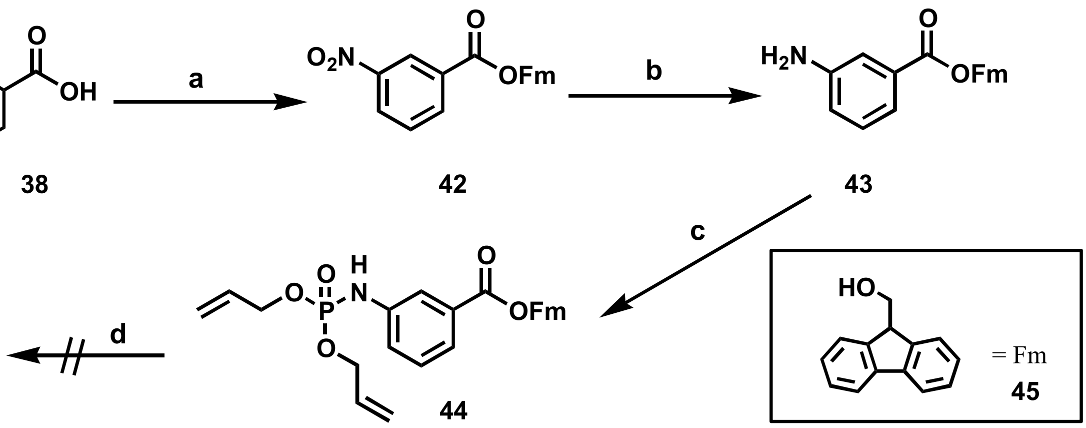


Abbildung 26: Synthese des Spacers 33, a) Fm-OH, DIC, DMAP, b) SnCl2, DMF c) (AllylO)$_2$POCl d) Piperidin/DMF.

Auf die säurekatalysierte Veresterung von **38** mit Isobuten zum tert-Butylester **46** folgte nun die Reduktion der Nitrogruppe zu **47**. Die Umsetzung mit Diallylphosphochloridat ergab **48** in 53 % Ausbeute. Erfreulicherweise war das Phosphoramidat unter den Bedinungen der tert-

Butylesterspaltung stabil, so dass **48** in einer Testreaktion nach HBTU/HOBt Aktivierung mit L-Alaninmethylester gekuppelt zu **49** werden konnte.

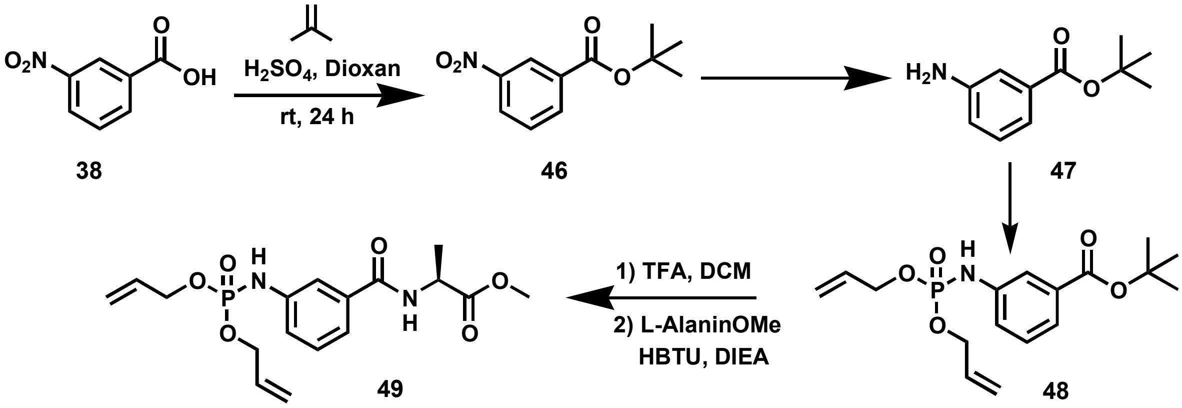


Abbildung 27: Alternative Synthesestrategie für den Spacer 33

Bei der geplanten Entschützung der Phosphorsäureester trat ein quantitativer Verlust der Phosphatgruppe auf. Auch der Einsatz von Silanen als Fänger statt des basischen Morpholins führte zu keinem positiven Resultat. Daher wurden an dieser Stelle die Phosphoramidatlinker aufgrund mangelnder Stabilität nicht weiter verfolgt und statt dessen die Entwicklung alternativer Strukturen vorangetrieben.

4.1.4.6.2 3-Phosphatidylbenzoesäure

Als Ursache für die Instabilität des Spacers **33** wurde die Labilität des Phosphoamidates, bedingt durch die NH Gruppe, angenommen. Die naheliegendste Alternative war der Ersatz der NH Gruppe durch ein Sauerstoffatom. Zunächst wurde ausgehend von 3-Hydroxybenzoesäure durch azeotrope Veresterung der Allylester 409 synthetisiert. Eine elegante Methode zur Phosphorylierung von Phenolen wurde von Silverberg et al. entwickelt.[122] Hierbei wird ein Phosphorigsäurediester in Gegenwart von CBr_4 direkt zum Phosphat umgesetzt.

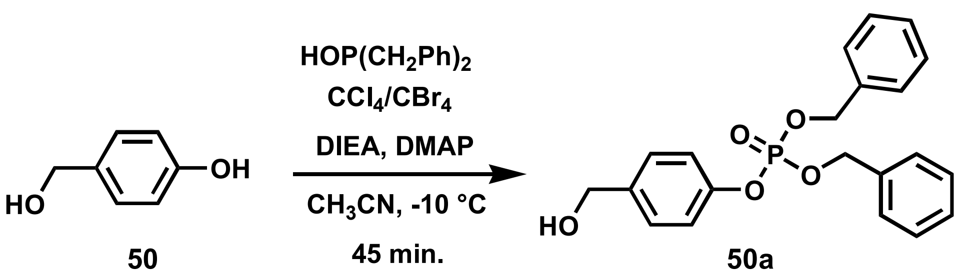


Abbildung 28: Synthese von Phenylphosphaten nach Silverberg et al.

3-Hydroxybenzoesäure **53** wurde mit Allylalkohol verestert. Die Literaturausbeuten der Phosphorylierung konnten zwar für einfache Phenole wie **50** reproduziert werden. Eine Phosphorylierung des Allylesters **54** gelang jedoch nicht, so dass **54** mit frisch synthetisiertem und destilliertem Bis-2-cyanoethoxyphosphoramidit **52a** phosphityliert wurde. Durch

Oxidation mit tBuOOH wurde die Verbindung **57** erhalten. Als bester Scavenger bei der nachfolgenden Entschützung zu **58** mit $Pd(Ph_3)_4$ erwies sich N-Methylmorpholin.

Bei der zweifachen Entschützung des Bis-β-cyanoethylphosphates wurde neben dem einfach entschützten Hauptprodukt auch 3-Hydroxybenzoesäure isoliert. Daher wurde eine leichter abzuspaltende Schutzgruppe für das Phosphat ausgesucht. Für den Einsatz eines Phosphorsäurefluorenylmethylesters sprach die Möglichkeit der milden Entschützung mit Piperidin in DMF. Die Synthese von Di-Fluorenylmethoxy-diisopropylphosphoramidit **52b** wurde zunächst optimiert. Neben dem selbstverständlichen Wasserausschluss bei der Synthese war die Reinigung besonders kritisch, da sich diese Verbindung nicht in Analogie zu **52a** destillieren lässt. Die anfänglich beobachtete Zersetzung bei der Flash-Chromatographie konnte durch ausführliche Deaktivierung mit Aceton und nachfolgend Triethylamin in Cyclohexan/Ethylacetat vermieden werden. Mit dem gereinigten **52b** konnten die Verbindungen **55** und durch Entschützung **56** synthetisiert werden. Auch die nachfolgende Testkupplung mit *L*-Alaninmethylester war erfolgreich, nicht jedoch die Entschützung der Fluorenylmethylester. Die begleitend auftretende Phenolesterspaltung gab Anlass dazu, einen alternativen Linker, der unempfindlich gegenüber Hydrolyse sein sollte, zu entwickeln.

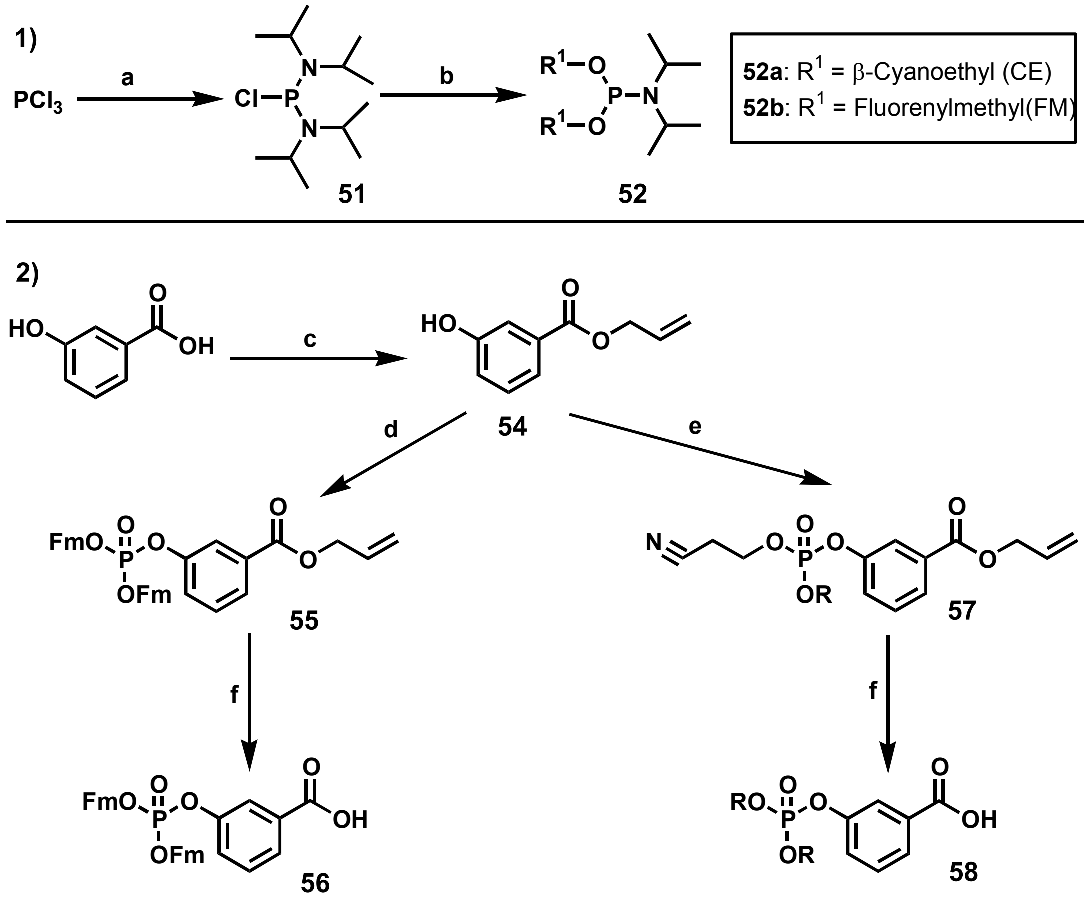


Abbildung 29: 1) Synthese der Dialkoxyphosphoramidite 52a und 52b. 2) Synthese der Spacer 56 und 58, a) $HNiPr_2$, Et_2O b) DIEA, R-OH, THF c) Allylalkohol, PTSA, Toluol, Rückfluß, d) 52b, Tetrazol, ^{t}BuOOH e) 52a, Tetrazol, ^{t}BuOOH f) $Pd(PPh_3)_4$, Morpholin, DMF

4.1.4.6.4 Synthese des para-Benzylphosphatspacers 34

Anstelle des problematischen Phenyoxyphosphorsäurelinkers **33** sollte ein Linker der Struktur **34** eingesetzt werden, da Benzylphosphate über eine größere Stabilität als Phenylphosphate verfügen.[118] Ausgehend von 4-Hydroxymethylbenzoesäure **59** konnte der Spacer **34** direkt durch Phosphorylierung mit **52b** erhalten werden. Die moderate Ausbeute von 32 % gab jedoch Anlass zur Optimierung. Durch Veresterung der Carbonsäurefunktion mit Allylalkohol zu **60**, Phosphorylierung und nachfolgender Esterspaltung konnte die Ausbeute von **61** auf 59 % (über 2 Stufen gesteigert werden).

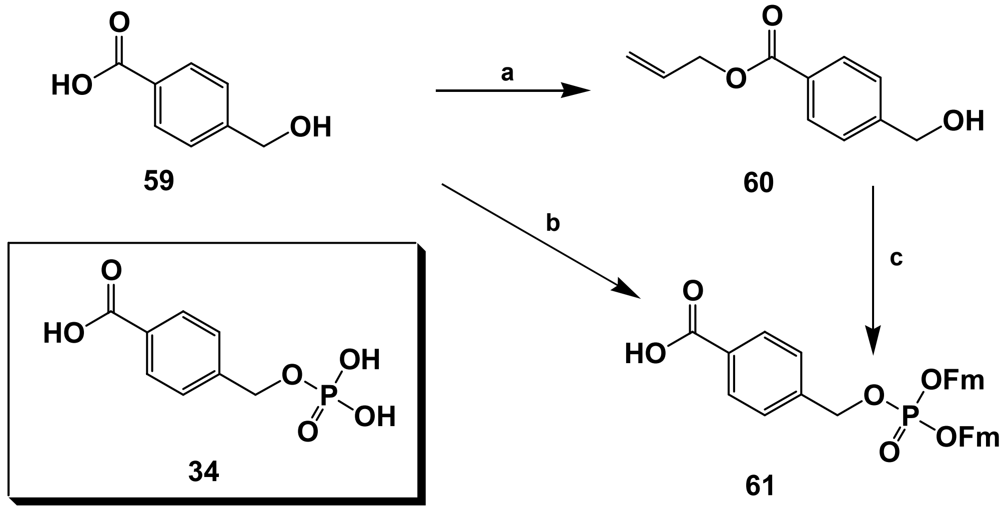


Abbildung 30: Synthese des Spacers 34, a) Allylalkohol, PTSA, Toluol, Rückfluss, b) 52b, Tetrazol, CH_2Cl_2, CH_3CN, d) 1) 52b, Tetrazol, CH_2Cl_2, CH_3CN, 2) ^{t}BuOOH, 3) $Pd(PPh_3)_4$, Morpholin, DMF

4.4.6.5 Synthese des Arylphosphonatspacers 36

Parallel zur Synthese von **34** wurde die Synthese des Linkers **35** durchgeführt. Dieser sollte nicht nur noch etwas stabiler sein als **34** sondern auch gleichzeitig eine andere geometrische Anordnung von Peptid und GTP zueinander ermöglichen. 3-Methylbenzoesäure **62** wurde daher säurekatalytisch mit Isobuten zum tert-Butylester **63** umgesetzt und radikalisch mit NBS bromiert. Eine Trennung des bromierten Produktes **64** vom zweifach bromiertem Nebenprodukt und verbliebenem Edukt war auf dieser Stufe nicht möglich.

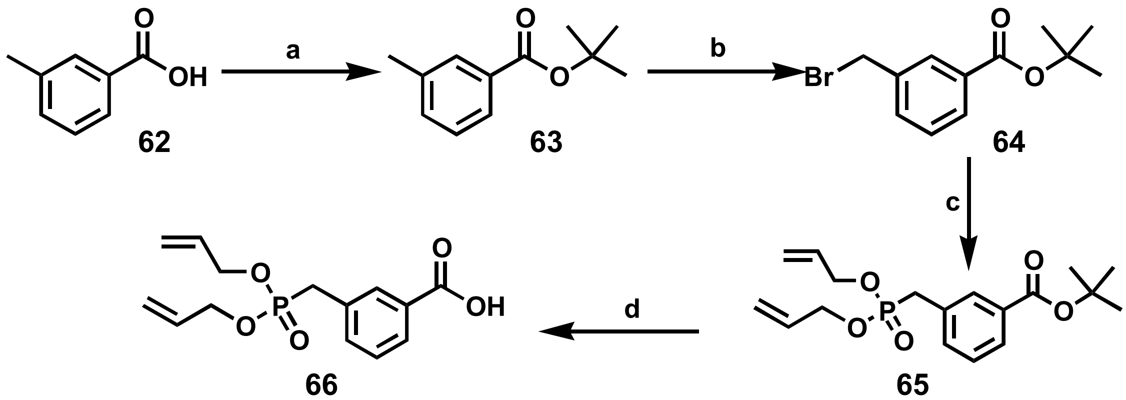


Abbildung 31: Synthese des Spacers 36, a) Isobuten, H_2SO_4, Dioxan, 24 h, 68 % b) NBS, CCl_4, DBP, hν, 3h, 78 %, c) Triallylphosphit, 80 °C, 18 h, 68 %, d) TFA, TES, CH_2Cl_2, 1h, 67 %.

Nach chromatographischer Vorreinigung wurde durch Erhitzen von **64** mit Phosphorigsäuretriallylester (Arbusov-Reaktion) das Phosphonat **65** erhalten. Auf dieser Stufe konnten die Nebenprodukte aus der Bromierungsreaktion chromatographisch abgetrennt werden. Nach Entschützung mit Trifluoressigsäure in Methylenchlorid konnte der geschützte Phosphonatspacer **66** in 24 % Ausbeute (über 4 Stufen, bezogen auf eingesetzte 3-Methylbenzoesäure) erhalten werden. Dieser Spacer wurde aufgrund seiner guten Stabilität für die Versuche zur Etablierung der GTP-Konjugatsynthese eingesetzt.

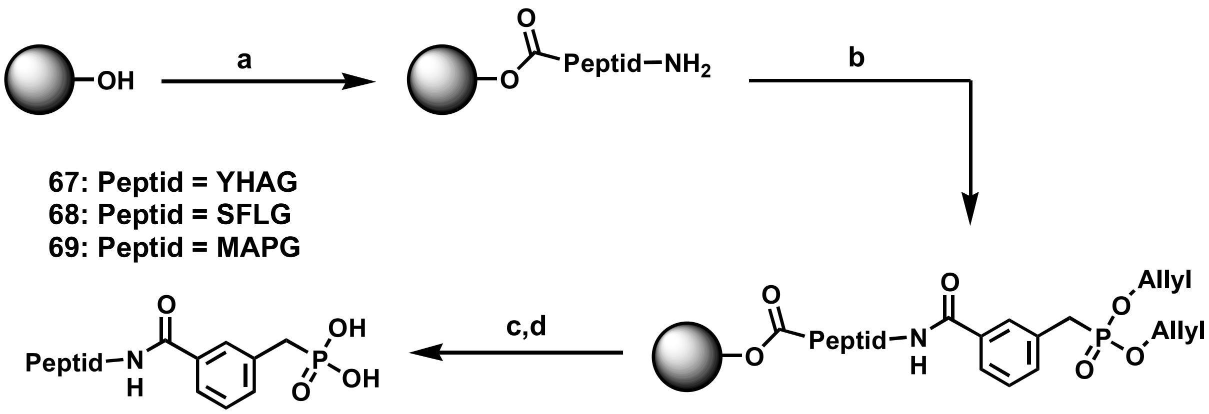


Abbildung 32: Synthese von Testpeptide mit Spacer 36 zur Optimierung der GTP Konjugatsynthese, a) SPPS, b) 66, HBTU, DIEA, DMF c) TFA, CH_2Cl_2, $PhSiH_3$, d) $Pd(PPh_3)_4$.

Mit Hilfe dieses Spacers **66** konnte nach der erfolgreichen Synthese von Testverbindungen die erste Split-Mix-Bibliothek von GTP-Konjugaten am Harz synthetisiert werden. Nachteilig im Bezug auf eine Anwendung in der Festphasensynthese war das Fehlen einer Methode, die Effizienz der Kupplung des Spacers an das Peptid zu messen. Für die Synthese weiterer kombinatorischer Split-Mix Bibliothek an der festen Phase unter Anwendung der mit dem Spacer **66** etablierten Methoden sollte daher ein flexibler, chemisch stabiler Spacer

synthetisiert werden. Dieser sollte außerdem eine lückenlose Kontrolle aller Syntheseschritte ermöglichen. Ein Spacer der Struktur **37** erfüllt diese Anforderungen.

4.1.4.6.6 Synthese des Phosphat Spacers 37

Monobenzylierung von Ethylenglykol **70** mit Benzylchlorid in THF mit einer katalytische Menge TBAI zu **71** und nachfolgende Umsetzung mit Bromessigsäuretertbutylester lieferte **72** in 43 % Ausbeute (über 2 Stufen). Nach hydrogenolytischer Entschützung konnte aus **73** durch Reaktion mit Diisopropyldifluorenylmethylphosphoamidit **52b** und Tetrazol in Acetonitril/Dichlormethan Verbindung **74** in 84 % Ausbeute erhalten werden. Entschützung mit TFA in Dichlormethan ergab **75**. Diese Verbindung wurde als Test an *L*-Phenylalaninmethylester gekuppelt. Auch die nachfolgende Entschützung von **76** mit Piperidin in DMF verlief erfolgreich, so dass **75** für die Festphasensynthese eingesetzt werden konnte. Dieser bis-Fluorenylmethyl- geschützten Phosphatlinker ist nicht nur gut zugänglich, sondern auch unter milden Bedingungen zu entschützen. Des Weiteren erfüllt er die Anforderung an eine lückenlose Reaktionskontrolle, da die Effizienz der Kupplung des Linkers auf die letzte Aminosäure an der festen Phase per Fmoc-Bestimmung quantifiziert werden kann. [123]

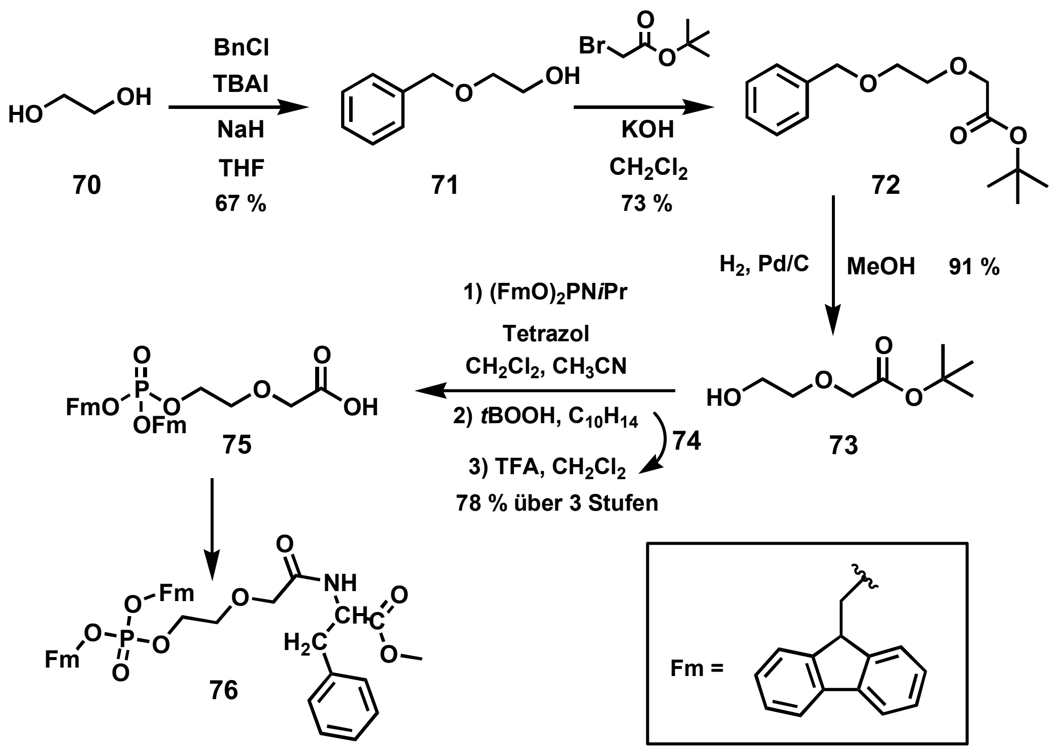


Abbildung 33: Synthese der Spacers 37

Der Linker ist auch in Lösung bei 50 °C mindestens 48 Stunden stabil, so dass eine für die Festphasensynthese ausreichende Stabilität attestiert werden konnte. Für die Synthese der

Test-Verbindungen wurde daher der Spacer **37** sowie der von H. Kunz und O. Seitz entwickelte HYCRON Linker verwendet.[124]

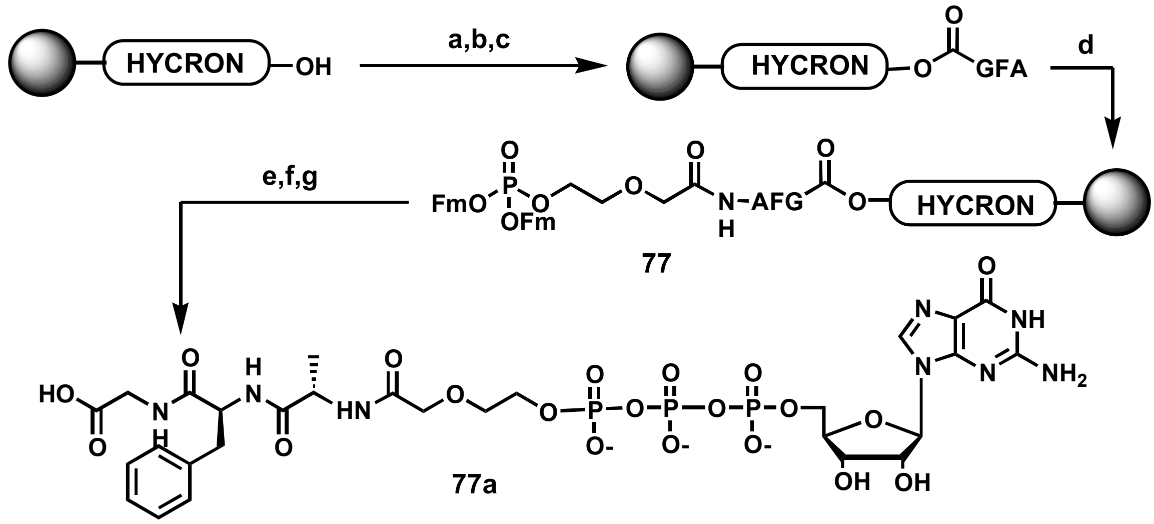


Abbildung 34: Synthese von Testverbindungen wie 77a mit dem Spacer 37, a) Fmoc-G, Cs_2CO_3, dann Piperidin/DMF b) Fmoc-F, HBTU, DIEA, dann Piperidin/DMF c) Fmoc-A, HBTU, DIEA, dann Piperidin/DMF, d) 37, HBTU, DIEA e) Piperidin/DMF f) GDP-Im, DMF, 50 °C g) $Pd(PPh_3)_4$, Morpholin, DMF.

4.1.4.6.7 Synthese des Spacers 35[§§]

Ein weiterer im Rahmen dieser Untersuchungen synthetisierter Spacer ist Verbindung **35**. Aus der engen Verwandtschaft zur Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe folgt die Labilität von **35** gegenüber Hydrogenolyse bzw. starken Säuren. Mit **35** wäre eine Deblockierung aller N-Termini auf einem Bead nach der biologischen Evaluierung möglich. Ausgehend von 3-Hydroxymethylbenzylalkohol **78** wurde durch Umsetzung mit *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid und Imidazol im DMF der mono-silylierte Alkohol **79** erhalten. Durch Umsetzung mit Difluorenylmethyl-N,N-diisopropyl-phosphoramidit **52b** konnte **80** quantitativ erhalten werden. Versuche, die Silylgruppe mit TBAF in THF zu entfernen, führten zu kompletter Zersetzung. Entschützung mit HF/Pyridin ergab jedoch in 86 % Ausbeute Verbindung **81**, welche nach chromatographischer Reinigung mit Phosgen zur Reaktion gebracht und als Testreaktion mit L-Phenylalaninmethylester zum Amid **83** umgesetzt werden konnte.

[§§] Die Synthesen dieses Spacer wurden parallel zum Screening der nachfolgend beschreibenen Bibliothek durchgeführt. Der Linker wurde noch nicht eingesetzt, sollte aber für zukünftige Bibliotheken den Vorteil bieten, dass bei der Edman Sequenzierung keine eventuell störende Spezies auf dem Bead ist.

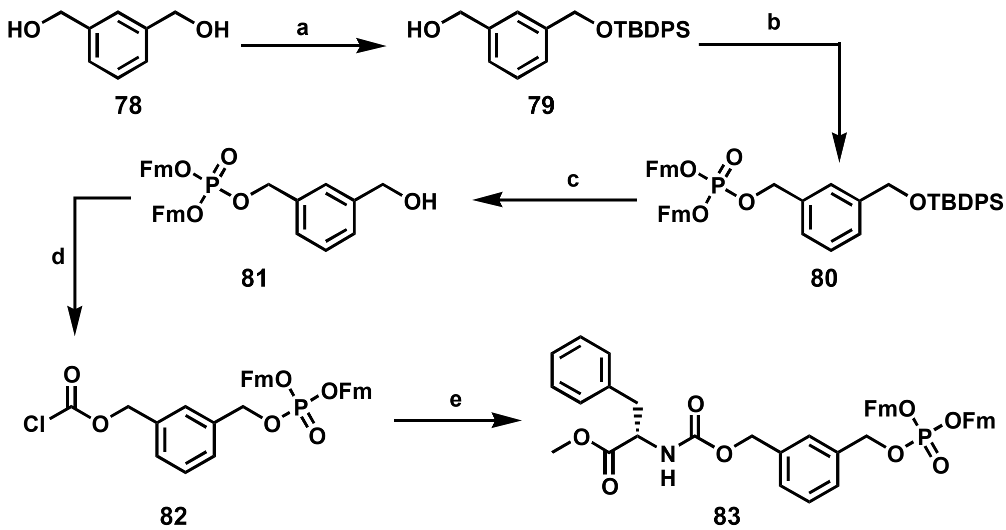


Abbildung 35: Synthese des Spacers 35. a) TBDPSCl, Imidazol, DMF, 24 h, Raumtemperatur b) 52b, Tetrazol, tBuOOH, -30 °C, 3h c) HF, Pyridin, 1h d) Phosgen, THF, 3h e) PheOMe, THF, DIEA, 2h

4.1.4.7 Linker zwischen Harz und Peptid

Ein Nachweis des Syntheseerfolges kann bei einer Split-Mix-Bibliothek nicht für jede einzelne Verbindung erbracht werden. Die Synthese und vollständige Charakterisierung einzelner GTP-Peptid Konjugate mit den für die Split-Mix-Synthese relevanten Aminosäuren wurde daher zunächst in Angriff genommen. Die für eine vollständige Charakterisierung notwenige Abspaltung der Produkte vom Harz macht Verwendung eines GTP kompatiblen Linkers erforderlich. Trotz umfangreicher Variation der Reaktionsbedingungen trat unter sauren Abspaltbedingungen wie sie für 2-Chlortrityl, Wang oder Sasrin- Linker erforderlich sind, jeweils komplette Zersetzung der Triphosphate auf. In Anlehnung an den von H. Kunz und O. Seitz etablierten HYCRON Linker[124] wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Laurent Soulere der in Abbildung 36 gezeigt Linker synthetisiert. Der Einbau eines Triethylenglykolspacers in den Linker, wie dies für den HYCRON Linker durchgeführt wurde, war wegen der hier beabsichtigten Verwendung von PEGA 1900 Harz (Copolymer aus Acrylamid und Polyethylenglykol – enthält Polyethylenglykolketten aus 1900 Monomeren als Spacer) nicht erforderlich. Die Linkersynthese konnte daher vereinfacht und optimiert werden. Durch Reduktion von Butindiol mit $LiAlH_4$ in THF wurde trans-1,4-Butendiol **85** erhalten, dass nach Reaktion mit Bromessigsäure-tert-butylester direkt mit Fmoc-Glycin verestert wurde. Nach Entschützung des tert-Butylesters **87** mit TFA in Methylenchlorid konnte das PEGA Harz mit dem vorbeladenen Linker verknüpft werden. Das Harz **88** diente in der Folge als Basis für die Synthese von Testsequenzen.

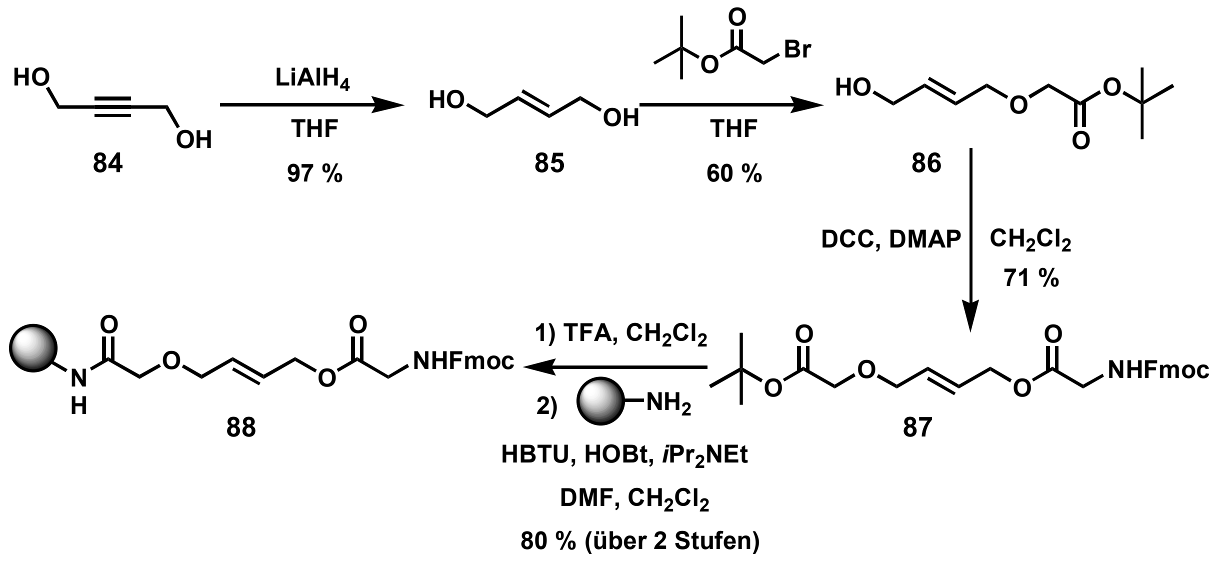


Abbildung 36: Synthese der Pd(0) labilen Linkers, vorbeladen mit Fmoc-Glycin

4.1.4.8 Analytische Methoden und Testsequenzen

Das mit dem Palladium (0) labilen Linker und der ersten Aminosäure beladene Harz **88** wurde in der Folge dazu verwendet, durch die Synthese von Testsequenzen die Grenzen der Synthesemethoden festzustellen. Mit Standardmethoden (AAV-1 bis AAV-3) wurden mehrere Peptide synthetisiert. Die Seitenketten der Aminosäuren waren entweder Allyl/Aloc geschützt (Lysin und Glutaminsäure) oder säurelabile Schutzgruppen (tert-Butyl oder Trityl). Letztere Schutzgruppen wurden aufgrund der bereits erwähnten Säurelabilität der Triphosphateinheit vor der Kupplung entfernt. Nach N-terminaler Entschützung mit Piperidin wurde der Spacer **37** nach Voraktivierung mit HBTU auf die Peptide aufgekuppelt und entschützt. Die in Abschnitt 4.4.4 beschriebene Methode der Aktivierung des GDP bedurfte einiger Optimierung, bis diese Methode reproduzierbare Resultate sowohl in Lösung als auch an der festen Phase ergab. Nach der Entschützung der Spacers wurde das Harz in absolutem DMF über Nacht in Gegenwart von frisch aktiviertem Molsieb getrocknet. Das kommerzielle Guanosin-5'-diphosphat-dinatrium Salz wird zunächst in das Tris (tributylammonium) Salz überführt. Letzteres ist in DMF löslich und kann gelöst mit CDI aktiviert werden. Überschüssiges CDI muss vor der Reaktion mit dem Phosphat durch Addition eines Äquivalents Methanol entfernt werden. Das aktivierte GDP **29** wird zum entschützten Phosphat gegeben und über Nacht bei 50 °C vorsichtig geschüttelt. Hierbei trat keine Reaktion des voraktivierten GDPs mit der freien OH Gruppe des bereits entschützten Threonins auf. Wie erwartet, übte das primäre Amid von Glutamin ebenfalls keinen störenden Einfluß auf die Reaktion aus. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 37 dargestellt.

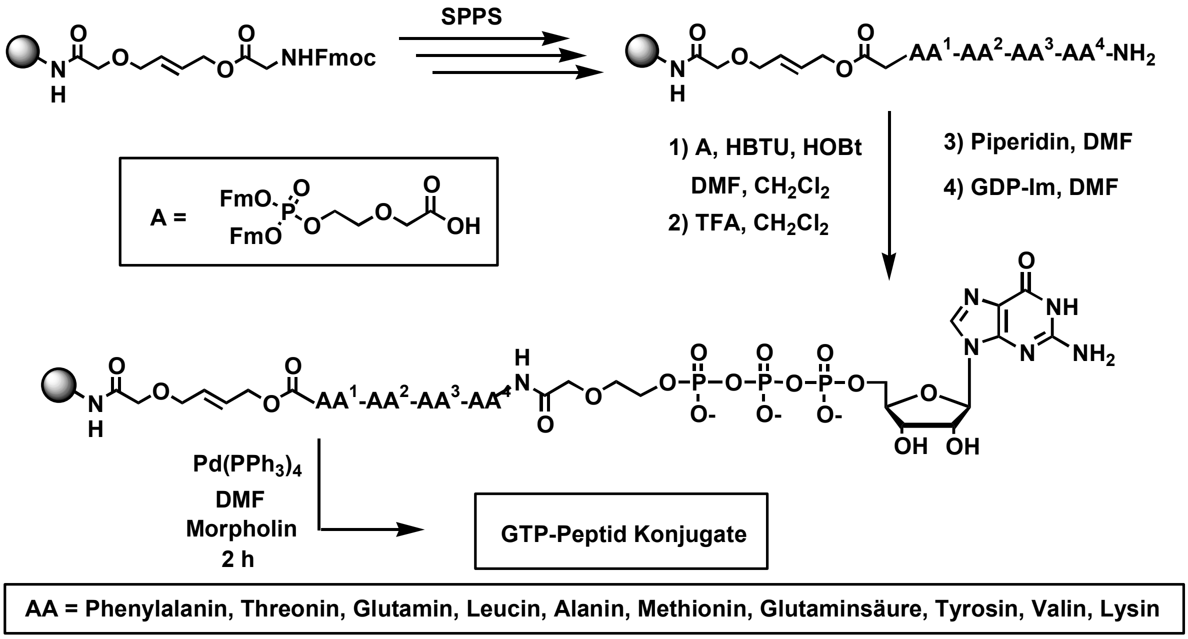
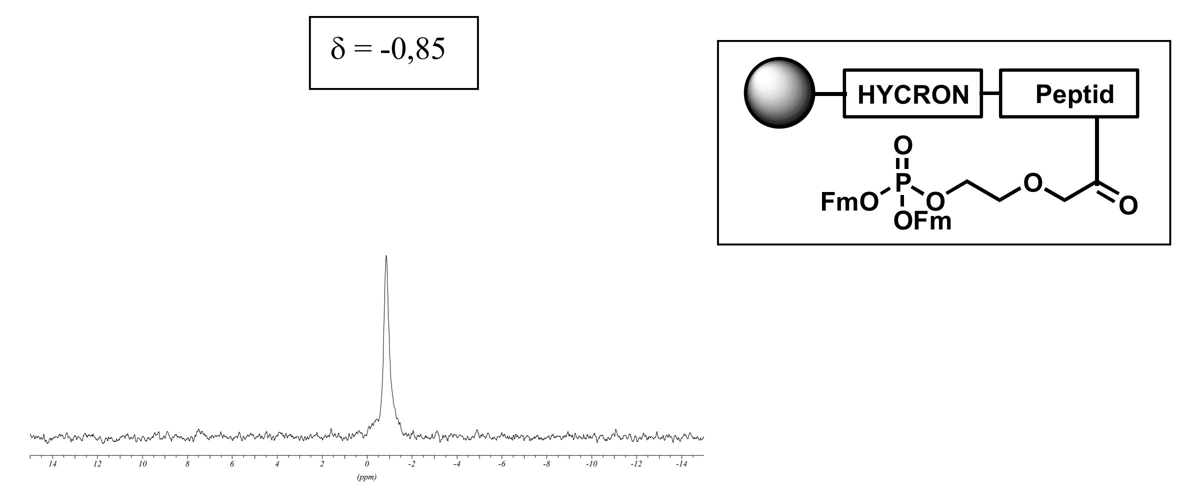


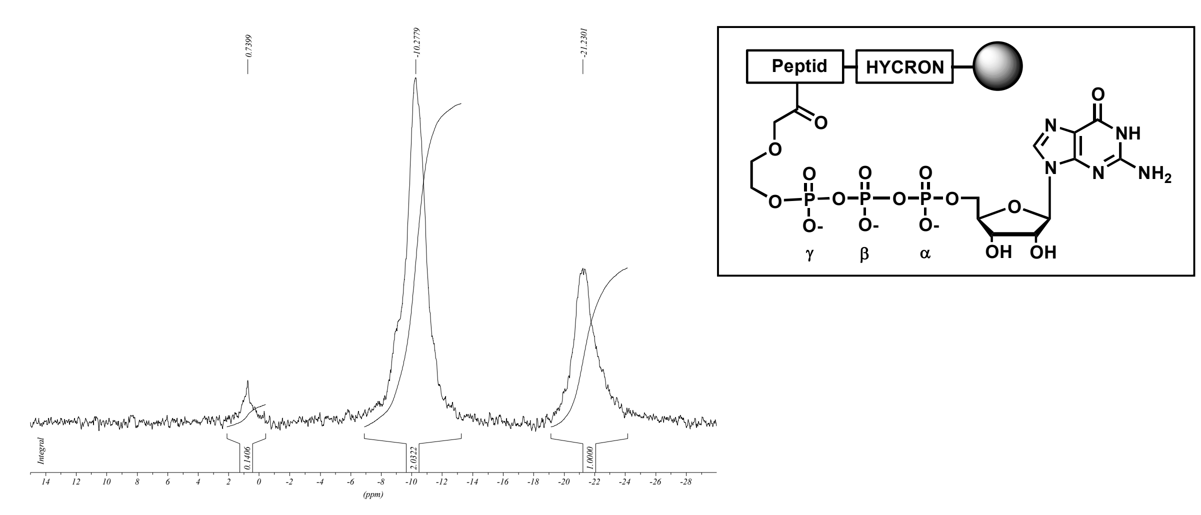
Abbildung 37: Synthese von GTP-Peptidkonjugaten mit dem Linker 84 und dem Spacer 37

Parallel zur Etablierung der Synthesemethoden an der festen Phase mussten auch die analytischen Verfahren optimiert werden. Der Aufbau der Pepide am Harz konnte durch UV-Bestimmung des Dibenzofulven-Piperidin Adduktes, durch Abspaltung einer kleinen Probe und Nachweis durch HPLC-ESI-MSsowie durch Kontrolle der Kupplungen durch Kaiser-Test (AAV-7) überwacht werden. Auch die Ausbeute bei der Kupplung des oben beschriebenen Phosphatlinkers konnte UV-spektrometrisch gemessen werden. Für den letzten Syntheseschritt an der festen Phase fehlte jedoch zunächst eine geeignete analytische Methode. Gesucht wurde eine Methode, die eine Echtzeit-Überwachung der Reaktion ermöglichte, so dass eine möglicherweise unvollständige Kupplungsreaktion durch Zugabe von weiteren Äquivalenten aktiviertem GDP zur Vollständigkeit gebracht werden konnte. Sowohl die Monophosphate, als auch die GTP Konjugate ließen sich nicht routinemäßig im ESI nachweisen. Eine Reinigung und Charakterisierung einer kleinen Probe mittels HPLC-ESI scheiterte ebenfalls. Der Nachweis im MALDI war trotz Variation zahlreicher Parameter nicht möglich. In Zusammenarbeit mit Dr. H. Prinz und K. Reinecke am MPI in Dortmund wurden zahlreiche Parameter (Detektion im positiven oder negativen Modus, Verwendung verschiedener Matices) variiert. Eine reproduzierbare, zuverlässige Analysenmethode konnte jedoch nicht entwickelt werden. Schließlich zeigte sich, dass jede der phosphorhaltigen Zwischenstufen auf dem Harz im ^{31}P-Gel-Phasen-NMR charakterisiert werden konnte. Zwar sind insbesondere bei Verwendung von PS Harz oder Tentagel die Linien deutlich verbreitert, die starken chemischen Verschiebungen lassen dennoch eine klare Aussage zu. Für eine akzeptable Linienbreite sind der Quellzustand des Harzes sowie die Lösungsmittelviskosität von entscheidender Bedeutung. Letztere beeinflusst die Sedimentationsgeschwindigkeit der Beads im NMR-Röhrchen. In einer Mischung von DMF:d_6-DMSO:Methylenchlorid im Verhältnis 6:3:1 ist die Sedimentation so langsam, dass eine gute Messung im NMR möglich

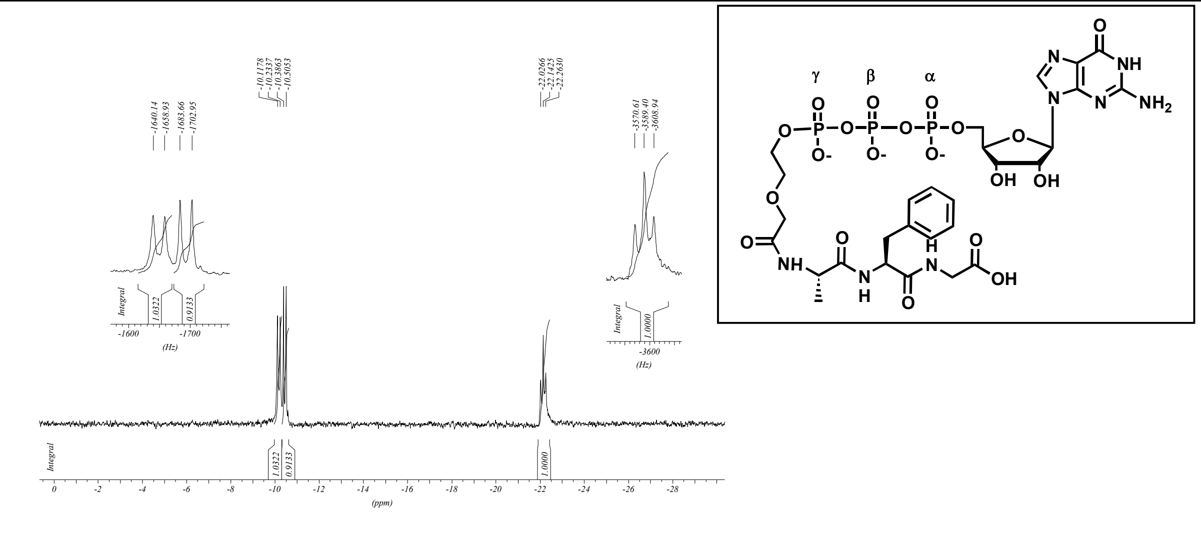
ist. Die in Abbildung 38 gezeigten Spektren wurden mit 1000 Scans in jeweils etwa 30 Minuten aufgenommen. Aus der relativen Integration des GDP bzw. der GTP Signal zum Signal des Phosphats kann der Umsatz berechnet werden. Die Isolierung der auf diese Weise an der festen Phase charakterisierten Peptide bestätigte die Interpretation der NMR Daten. Die Kopplung von α- zum β Phosphat (GDP) wird im Produkt durch eine Kopplung vom γ- zum β-Phosphat ergänzt. Letztere belegt, dass keine Reaktion z. B. mit der OH Gruppe des Threonins stattgefunden hat.



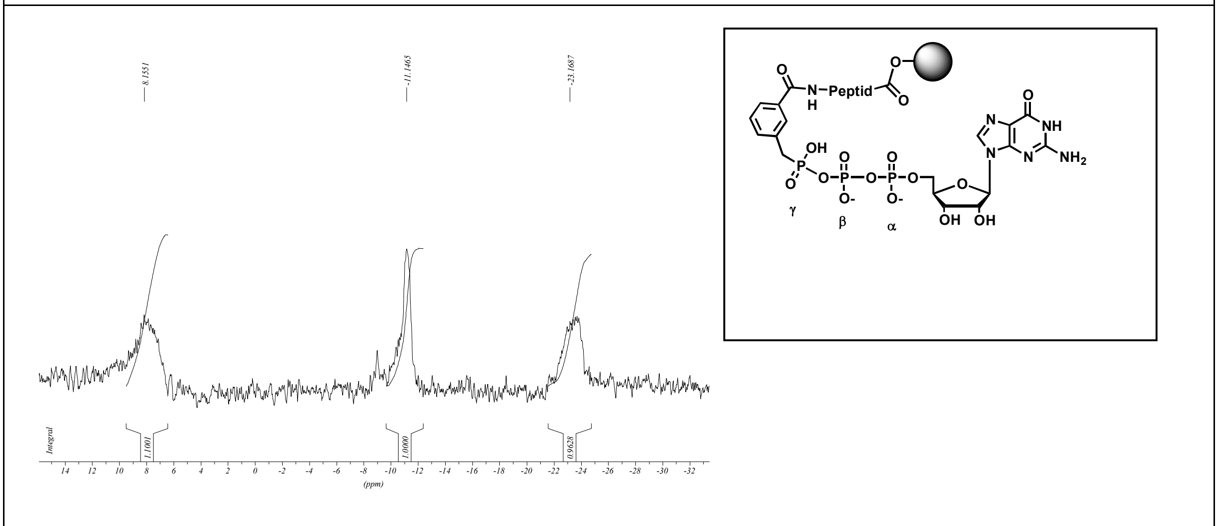
Verbindung **77** (vor der Kupplung mit GDP), On-bead Gel-Phasen NMR, 1000 scans



Verbindung **77a**, Gel-Phasen NMR (nach der Kupplung mit GDP), δ = 0,74 (nicht umgesetztes Phosphat), -10,3 (β- und γ-P), -21,23 (β-P).



Verbindung **77a**, ^{31}P-NMR in Lösung, δ = -10,15 (α-P), -10,45 (γ-P), -22,13 (β-P)



Gel-Phasen NMR der Split-Mix Bibliothek vor dem Screening, δ = 8,16 (γ-Phosphonat), -11,15 (β-P), -23,17 (α-P).

Abbildung 38: ^{31}P-NMR Spektra von GTP-Peptid Konjugaten.

Die Isolierung und Charakterisierung der Modellverbindungen validierte die verwendeten Synthesemethoden und analytischen Verfahren. Damit war auch die Annahme berechtigt, dass die Beads der Split-Mix-Bibliothek tatsächlich die Zielverbindungen enthielten. In kleinen Testansätzen (siehe Kapitel 4.1.4.11) konnte gezeigt werden, dass die hier beschriebene Methodik auch zur kombinatorischen Festphasensynthese von ATP-Peptidkonjugaten verwendet werden kann. Diese könnten als Werkzeugen zur Studie ATP-bindender Proteine (z. B. Kinasen und Hitzeschockproteine) Anwendung finden.[125-127]

4.1.4.9 Auswahl der festen Phase und des Fluoreszenzfarbstoffes

Für einen on-bead Assay ist es vorteilhaft, wenn das fluoreszenzmarkierte Protein auch in die Poren des Beads gelangen kann und daneben auch eine selektive Bindung eingeht. Die gemessene Fluoreszenz sollte direkt mit der Proteinbeladung der Beads zusammenhängen und nicht durch Hintergrundfluoreszenz verfälscht werden. Vor der Synthese und Evaluierung

einer Split-Mix-Bibliothek stand daher die Auswahl einer geeigneten festen Phase sowie eines geeigneten Fluorophors. Der Erfolg von CPG-Beads (CPG = controlled pore glass) bei der DNA Synthese, ihre hohe mechanische Stabilität und die aufgrund des relativ großen Durchmessers gute Möglichkeit zu manueller Selektion, sowie das Fehlen von UV-aktiven Funktionalitäten ließ eine Untersuchung dieser Festphase sinnvoll erscheinen. Es zeigte sich jedoch, dass unter den für den Assay notwendigen Bedingungen eine Denaturierung des Ras Proteins auf der Oberfläche der CPG Beads stattfand. Die gute Verfügbarkeit gab Anlass zur Verwendung von Dansyl-markiertem H-Ras als Testprotein. Leider zeigten sowohl Tentagel-S, Tentagel-Makrobeads, als auch das ebenfalls getestete PEGA Harz im Bereich der Dansylfluorezenz eine starke Hintergrundfluoreszenz. Die Verwendung eines bei größeren Wellenlängen absorbierenden Farbstoffes war also notwendig. Cy5 wäre eine Option gewesen, die Wahl fiel jedoch auf Atto 655 (siehe Abbildung 39), das im Bezug auf Preis und Photostabilität Cy5 überlegen ist. Es wurde daher im Hinblick auf die Anwendung leistungsstarker Kryton-LASER verwendet. Im Bereich der Absorption (647 nm) und Emission (680 nm) zeigen weder Tentagel, noch PEGA Beads eine Hintergrundfluoreszenz. Trotz der guten Quelleigenschaften von Tentagel in wässrigen Medien, erwies sich Tentagel als Harz für den on-bead Assay als unbrauchbar.

Exploratorische Versuche mit GTP beladenem Tentagel zeigten zwar eine Wechselwirkung des Proteins mit dem GTP auf der Oberfläche, Schichtaufnahmen im konfokalen Lasermikroskop belegten jedoch, dass Tentagel entgegen der Herstellerangaben für ein Protein von 21 kD (Ras) nicht ausreichend permeabel ist.[128] Gut geeignet für den Assay ist das von M. Meldal entwickelte PEGA Harz.[129,130] Aufgrund der wesentlich geringeren Beladung bei gleichzeitem starken Aufquellen des Harzes in DMF, mussten die Reaktionsbedingungen geringfügig angepasst werden. Die Lösungen der Reagentien wurden verdünnt, die Reaktionszeiten für die Kupplungen von 2 Stunden auf 4 Stunden heraufgesetzt. Die Kupplungen mit GDP wurden wie zuvor bei 50 °C für 14 Stunden durchgeführt.

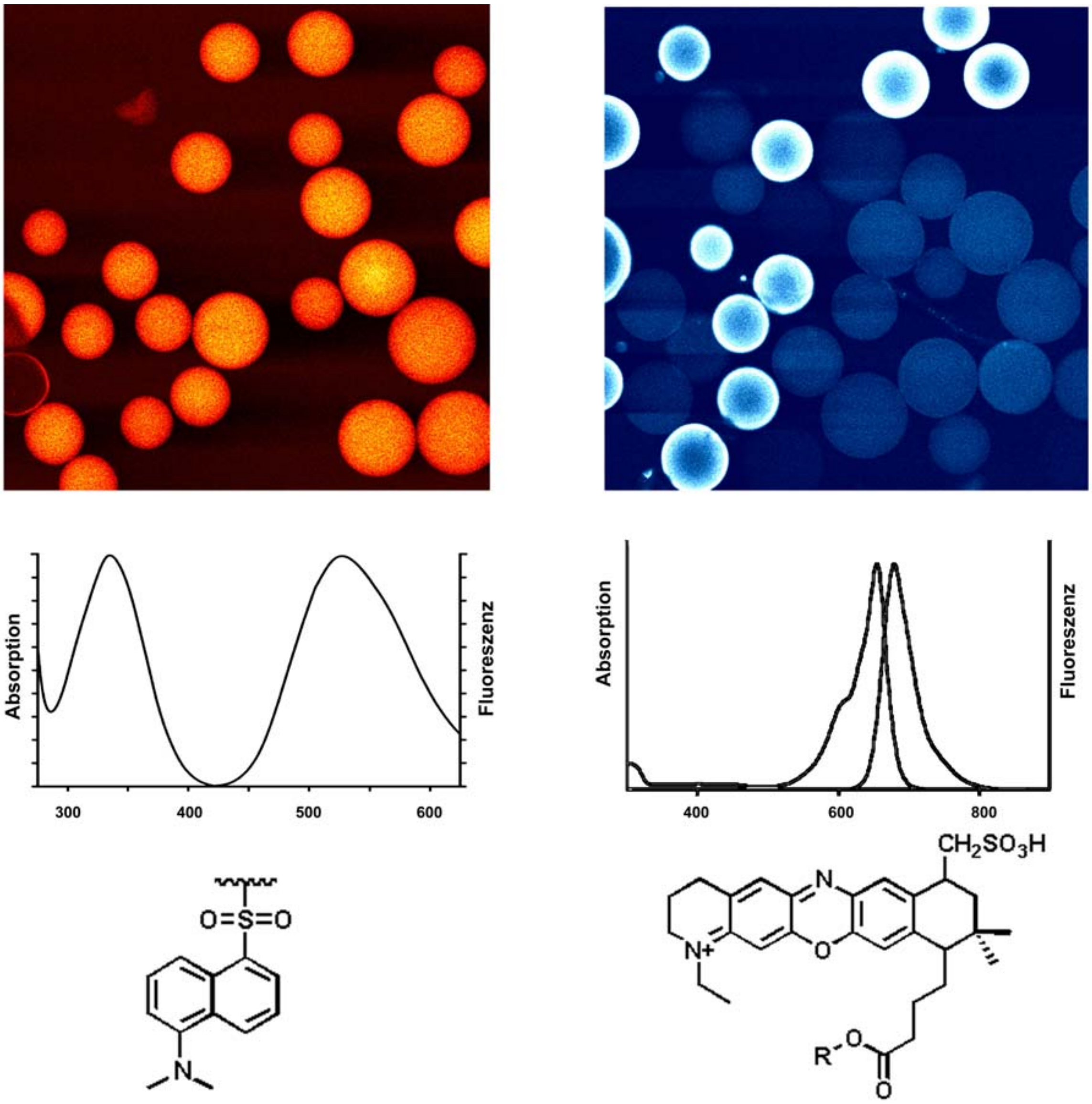


Abbildung 39: Eine Anregung des Dansyl-Farbstoffes führt zu intensiver Hintergrundfluoreszenz aller Beads (linke Seite). Bei Anregung von Atto 655 zeigen nur Beads mit GTP – beladen mit Atto655-Ras eine Fluoreszenz (rechte Seite)

4.1.4.10 Synthese einer Split-Mix Bibliothek und biologische Evaluierung

Da sämtliche Bestandteile der in Abbildung 21 gezeigten Struktur der Split-Mix-Bibliothek nun vorlagen, konnte diese unter Kontrolle durch die ebenfalls etablierten Methoden synthetisiert werden. Die acht ausgewählten Aminosäuren Glutaminsäure, Lysin, Alanin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Isoleucin und Glycin bieten die Möglichkeit von hydrophilen, lipophilen und Coulomb Wechselwirkungen. Die Verwendung von Prolin und Glycin sollte verschiedene Konformationen ermöglichen (siehe Kapitel 4.1.4.1). Anstelle der Reaktionskontrolle durch Fmoc-Bestimmung wurde bei der Split-Mix Synthese jede Kupplung durch einen Kaiser Test überprüft. Bei einem Einsatz von 4 Äquivalenten

voraktivierter Aminosäure war eine Reaktionszeit von 4 Stunden für einen quantitativen Umsatz bei den Kupplungsreaktionen ausreichend. Bei der Synthese einer Split-Mix-Bibliothek wird stets eine statistische Verteilung der möglichen Sequenzen angestrebt. Um zu gewährleisten, dass alle möglichen Sequenzen tatsächlich in vergleichbaren Mengen bei der Split-Mix Synthese entstehen, muss das Harz nach den Misch-Schritten gleichmäßig auf alle Reaktoren verteilt werden. PEGA Harz sollte normalerweise nicht getrocknet werden, um Form und Funktion nicht zu beeinträchtigen. Das Trocknen und Abwiegen des PEGA Harzes schied also als Möglichkeit aus. Ein Abwiegen des feuchten Harzes führte stets zu ungleichen Mengen in den einzelnen Reaktoren. Als Suspension in einem Gemisch von DMF, CH_2Cl_2 und Methanol (80:15:5) konnte das Harz mittels Eppendorf-Pipette bestens aliquotiert werden. Auch der humane Einfluss auf die Effizienz der Durchmischung und der Wasch-Schritte konnte eliminiert werden, in dem die Synthese für die Durchführung auf einem Quest 210 Synthese-Halbautomaten adaptiert wurde.

4.1.4.11 Durchführung des On-bead Screening

Vor dem Screening wurde eine Probe von G12V Ras mit Atto-655 gelabelt (siehe Experimenteller Teil). Das Protein wurde von Lars Blumenstein (Abteilung Prof. Wittinghofer) in E.Coli überexprimiert und gereinigt und für diesen Assay freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Wahl eines kompetitiven Bindungsassay als geeignetes Werkzeug um die Wechselwirkung kleiner Moleküle mit Proteinoberflächen zu evaluieren wird durch Untersuchungen von J. B. Owalabi et al. bestätigt. Hier gelang es in vollkommen analoger Weise ein kleines Molekül zu identifzieren mit dem die Interaktion des Nerve Growth Factor mit der Kinase Trk A inhibiert werden konnte.[131] Um unspezifische Bindungsstellen am Polymerbead zu blockieren, wurden die mit GTP-Peptid Konjugaten beladenen PEGA-Beads vor der Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Ras mit einem BSA-Puffer für 3 Stunden inkubiert. Die guten Quelleigenschaften von PEGA in wässrigen Medien machten ein organisches Cosolvens für alle Inkubationsschritte unnötig. Anschließend wurde der Puffer entfernt und ein Puffer mit Atto655*Ras für 30 Minuten zugegeben. Die Anwesenheit von ETDA hierbei sollte sicherstellen, dass ein schneller Austausch der GTP Liganden gewährleistet ist. Nach 30 Minuten wurde der Protein-Puffer entfernt und ein Mg^{2+} haltiger Puffer zugegeben. In Gegenwart von Magnesiumionen sinkt die Dissoziationsrate des Ras-GTP Komplexes drastisch ab, so dass durch diese Vorgehensweise das Protein am Bead fixiert wurden. Diese Beads wurden zunächst mit einen konfokalen Laser Fluoreszenzmikroskop untersucht. Zur Überprüfung, ob die gemessene Fluoreszenz tatsächlich mit der GTP Beladung der Beads korreliert, wurden ADP und XDP an den PEGA gebundenen Phosphatspacer **35** gekuppelt und mit Atto655-Ras (in Abwesenheit von freiem GTP) gekuppelt.[132] Die Affinität von ATP und XTP zu Ras ist um den Faktor 10^3(XTP) bzw. 10^7 (ATP) niedriger als GTP. Erwartungsgemäß zeigten die ATP- und XTP-beladenen Beads nur eine sehr schwache bzw. keine Fluoreszenz. Bei der Durchführung des Assays sollte ein

großer Überschuss von GTP sicherstellen, dass nur solche Liganden mit guter Affinität auch durch die Fluoreszenz detektiert werden. Die Konzentration von Atto655-Ras in der Lösung wurde auf 1mM eingestellt (0,03 µmol in 30µl), die Gesamtkonzentration an GTP war mit 1 M deutlich höher (siehe Experimenteller Teil). Durch die Anwesenheit von GTP in der Lösung (Konzentration 1 mM) konnten Konjugate mit sehr geringer Affinität nicht an Atto655-Ras binden. Die Zahl der stark fluoreszierenden Beads lag unter 1 ‰. Nur diese GTP-Peptiden verfügen über eine ausreichende Affinität zu Ras, um mit dem GTP in Lösung konkurrieren zu können. Die Konzentration dieser Verbindungen lag bei etwa 1mM, und entspricht der Konzentration des freien GTP. Die Affinität dieser festphasen-gebundenen GTP Peptid-Konjugate dürfte daher im Bereich von GTP oder darüber liegen, also um unteren picomolaren Bereich. Als Referenzpunkt für die Bewertung der sequenzierten Hits ist jedoch nicht GTP sondern DABP-GTP zu verwenden. Die Affinität von DABP-GTP zu Ras ist jedoch um den Faktor 400 geringer als die von GTP[133] (siehe Kapitel 2.2.2.1.1). Somit wird durch die gute Affinität der Peptide der Affinitäts-reduzierende Einfluss der Substitution am γ-Phosphat kompensiert. Da im verwendeten Assay die Menge des festphasengebundenen Atto655-Ras nicht quantifiziert werden konnte, ist die Angabe einer exakten Dissoziationskonstante für den Komplex aus Ras und GTP-Peptid nicht möglich. Dieser könnte zukünftig durch Messung in Lösung bestimmt werden (siehe Kapitel 5.2). In Abbildung 40 sind Aufnahmen der Split-Mix-Bibliothek nach der Inkubation mit Atto655-Ras gezeigt. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte in diesem Falle durch einen Kr-Ar-Laser bei 647 nm. Die Emission wurde bei 680 nm registiert. Gezeigt sind stark vergrößerte Ausschnitte mit fluoreszierenden Beads („Hits"). Die mit dem konfokalen Mikroskop gemachten Schichtaufnahmen bestätigen, dass sich auch fluoreszenzmarkiertes Protein im Inneren des Beads befindet. Die Selektion einzelner Beads musste unter einem Mikroskop mit einen Mikromanipulator durchgeführt werden, da die Genauigkeit manueller Selektion für die gegebene Beadgröße nicht ausreichend ist. Gegen die Verwendung des konfokalen Mikroskops für dieses Screening sprach das Fehlen eines Objektivs mit geringer Vergrößerung, sowie das Nicht-Vorhandensein eines fein-justierbaren Mikromanipulators. Anstelle des konfokalen Laser-Mikrokops wurde für die Isolierung der Beads daher ein für Mikroinjektionen gebautes Mikroskop mit Mikromanipulator verwendet. Als Lichtquelle diente eine Quecksilber-Höchstdrucklampe. Anstelle der computergesteuerten Photomultiplier wurde das inverse Mikroskop mit einem Cy5 Filtersatz versehen, der auch für die Untersuchung von Atto655 markierten Objekten geeignet ist. Für die manuelle Selektion der Beads wurde an die Spitze des Mikromanipulators eine kleine Nylonschlinge („Hampton Research Cryo Loop") montiert. Die Schlinge wurde unter optischer Kontrolle um die fluoreszierenden Beads gelegt und diese dann zunächst von den nicht-fluoreszierenden Beads separiert. Die so vereinzelten Beads wurden mit einer Pipette in ein Eppendorf SafeLock® transferiert und dort gewaschen.

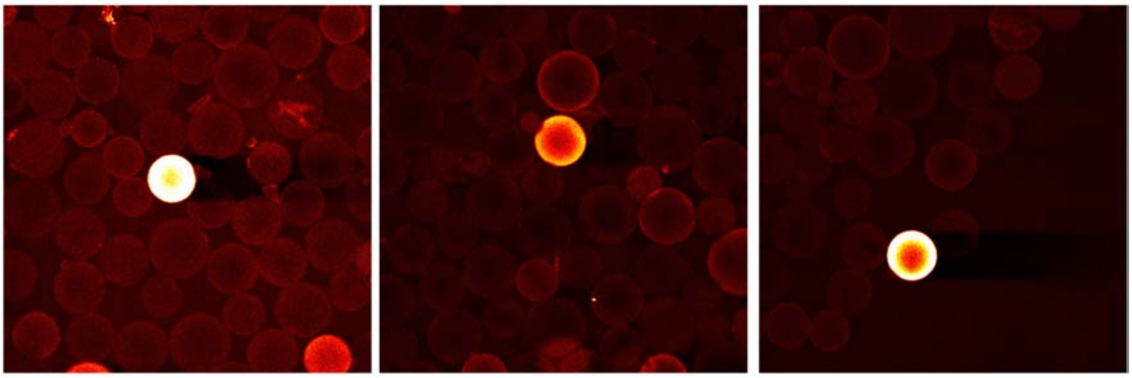


Abbildung 40: Bilder der Split-Mix-Bibliothek. Die fluoreszierenden Beads heben sich deutlich vom Rest ab, der kein Atto655*Ras gebunden hat.

Durch Behandlung mit Guanidiumchorid, Natrium-dodecylsulfat und EDTA konnte das Protein von den Beads entfernt werden. Durch Behandeln mit 95 % TFA in Dichlormethan wurden die *N*-terminalen Boc-Gruppen entfernt und die Beads damit für die automatische Edman Sequenzierung vorbereitet.

4.1.4.12 Edman Sequenzierung

Nach dem Entfernen der Boc-Schutzgruppe wurden die Beads in Wasser suspendiert und bei 4 °C zur Sequenzierung bei der BASF AG in Ludwigshafen gebracht. Die nach dem Waschen in einem Eppendorf SafeLock® gelagerten Beads wurden dazu unter mikroskopischer Kontrolle vereinzelt und auf einer Teflonmembran fixiert. Insgesamt konnten 7 Beads sequenziert werden. Die detektierten Sequenzen sind in Tabelle 2 aufgeführt:

Sequenz	AIAPA (89)	GAMGA (90)	GAP(ME) (91)	(M)PPA(E) (92)	MPF(E)M (93)	(Y)MM(LL) (94)	PGPMG (95)
Menge/Bead (pmol)	25	40	45	30	15	15	25

Tabelle 2: Resultate der Edman Sequenzierung bei der BASF AG. Die Aminosäuren in Klammern konnten in der Sequenzierung nicht eindeutig bestimmt werden. Diese Sequenzen wurden daher bei der weitergehenden Analyse weniger stark gewichtet.

Die erste Sequenz diente zur Kontrolle der Bibliothek. Dieser Bead wurde vor der Inkubation entnommen und mit TFA behandelt. Bei 32768 theoretisch möglichen Sequenzen und einer Hitrate von ca. 1 ‰ (~33 Hits) stellen die sechs sequenzierten Beads eine repräsentative Probe dar. Die bei der Sequenzierung gemessene Beladung von 15 bis 45 pmol entspricht exakt den Berechnungen. Gemäß Herstellerangaben haben die Beads eine Ausgangsbeladung von ca. 150-300 pmol. Bei der fünften Kupplung wurden 10 % Boc-Aminosäure verwendet. Dies bestätigt auch die spektroskopischen Messungen die eine quasi-quantitative Umsetzung bei allen Peptidkupplungen angezeigt hatten. Da keine der Sequenzen dem *N*-Terminus von

Ras (MTEYKLVV) entspricht, reicht das Waschen der Beads und die nachfolgende Behandlung mit TFA aus, um jegliche Proteinreste vom Bead abzulösen. Die Aminosäuren in Klammern ergaben zwar bei der HPLC Analyse der Edman-Aminosäuren ein eindeutiges Signal, dies konnte jedoch nur einer modifizierten Aminosäure zugeordnet werden. In einigen Fällen könnte diese Aminosäure dem oxidierten Methionin entsprechen – eine Oxidation bei der ohne Luftausschluß durchgeführten Boc-Entschützung wäre denkbar. Da aber die Bibliothek kein Tyrosin enthielt, muss die sechste Sequenz, zumindest in dieser einen Position, angezweifelt werden.[***]

4.1.4.13 Analyse der Sequenzen

Gemäß Abbildung 12 in Kapitel 2.3.2.1 dient die Synthese von Peptiden zur Identifikation von Schlüssel-Interaktionen der Liganden mit dem Protein. Um den nächsten Schritt, die Synthese von Peptidmimetika vorzubereiten, mussten die vorliegenden Ergebnisse rationalisiert werden. Neben einer deutlichen Bevorzugung hydrophober Aminosäuren ist das Fehlen von Lysin in den Peptidsequenzen auffällig. Offenbar eignet sich eine Amino- oder Ammoniumgruppe nicht für die Bindung im Bereich der GTP Bindungstasche. Den Sequenzen GAPME, MPPAE, und PGPMG ist ein Prolin in der dritten Position gemein. Die Sequenzen GAMGA und YMMLL weisen in dieser Position ein Methionin auf. Mittels GOLD Docking wurde versucht, die Bevorzugung der gefundenen Sequenzen zu rationalisieren. Die Probleme der in GOLD implementierten Scoring Function mit der korrekten Bewertung der Interaktion zwischen kleinen, hydrophoben Molekülen und einem Rezeptor stören hier nicht, vielmehr ist diese Aufgabe (jedes der Peptid-GTP Konjugate hat über 30 frei drehbare Bindungen) ideal für einen genetischen Algorithmus. Die experimentell nach Screening und Sequenzierung als vorteilhaft bewerteten Sequenzen wurden daher zusammen mit der Kontrollsequenz KKKKK einem Docking mit GOLD unterzogen. Hierbei wurde eine kovalente Bindung zwischen dem N-Terminus des Peptids und dem GTP definiert, so dass GOLD lediglich die optimale Konformation ermitteln musste. Die Dockings wurden jeweils dreimal wiederholt um einen Einfluss der bei der Initialisierung des genetischen Algorithmus verwendeten Zufallszahl zu eliminieren. Erfreulicherweise wurden die experimentell als aktiv selektierten Peptide deutlich besser bewertet als die Kontrollsequenzen. Die GOLD-Scores sind in Tabelle 3 aufgeführt.

[***] Trotz intensiver Fehlersuche zusammen mit den Technikern bei der BASF AG konnte die Fehlerquelle nicht identifiziert werden.

Peptidsequenz	Bindung an Ras	GOLD Fitness
KKKKK (96)	-	2,55
MPFEM (93)	+	22,04
GAMGA (90)	+	29,30
GAPME (91)	+	28,14
MPPAE (92)	+	25,81
PGPMG (95)	+	25,40
YMMLL (94)	+	23,51

Tabelle 3: Resultate des GOLD Dockings

Die Bindungsmodi von MPPAE, YMMLL und PGPMG sind exemplarisch in Abbildung 42 dargestellt. Die anderen Peptide binden in vergleichbaren Konformationen. Das Resultat des Dockings von KKKKK zeigt, dass einige der Seitenketten keinerlei Wechselwirkung mit Ras eingehen, während die Bindungsmodi der in der Sequenzierung gefundenen Peptide sehr gut zur in Abschnitt 4.1.2 gezeigten Hydrophobizitätskarte passt. Beide markierten hydrophoben Stellen finden im Peptid an Position 3 ihr passendes Gegenstück. Entweder findet sich hier ein Prolin oder ein Methionin. Die Bevorzugung dieser Aminosäuren in dieser Position könnte auch erklären, warum die mittels PEP entworfenen und anschließend synthetisierten Peptide (siehe Kapitel 4.1.3) offenbar nicht in ausreichendem Maße an Ras binden konnten. Keine der synthetisierten Sequenzen weist ein Prolin oder Methionin an der besagten Stelle auf.

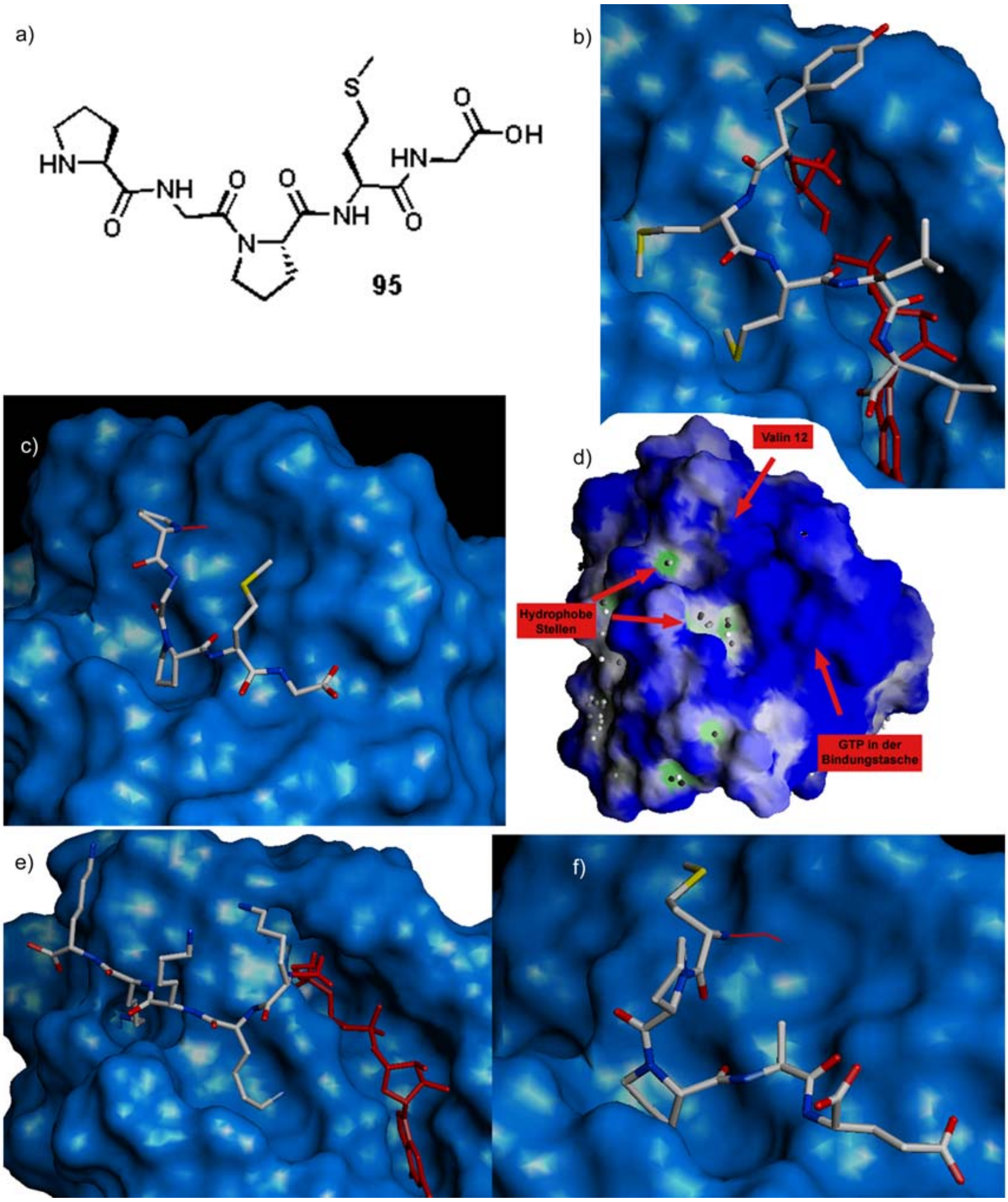


Abbildung 41: Bindungsmodi der Peptide a) Struktur von PGPMG, b) Bindung von YMMLL and Ras c) Bindung von PGPMG an Ras, d) Hydrophobizitätskarte von Ras zum Vergleich, e) Bindung von KKKKK an Ras, f) Bindung von MPPAE an Ras.

4.1.5 Nächster Entwicklungsschritt: Peptidmimetika

Die vorgeschlagene Bindungskonformation von PGPMG zeigt das Molekül in einer *Turn*-ähnlichen Form. Für diese Strukturelement gibt es zahlreiche bioisostere Strukturen. Für das Design von Mimetika für **95** wurden die in Abbildung 42a gezeigten Strukturen ausgewählt, da diese analog zu Prolin hydrophobe Wechselwirkungen begünstigen könnten und eine ähnlichen Orientierung der Substituenten ermöglichen. Die Strukturen wurden manuell in die Ras Struktur in einer Weise gedockt, die eine ähnliche Orientierung der Substituenten R^1(R^4) und R^2(R^5) wie im Prolinpeptid erlauben. Neben der hydrophoben Wechselwirkung sollten

weitere wichtige Interaktionen zwischen Peptid und Ras erhalten bleiben. Eine Analyse der möglichen Wasserstoffbrücken zwischen **91-95** und Ras zeigte, dass eine Wechselwirkung mit Lys 117 und Asn 85 bei allen Peptiden gefunden wurde (siehe Tabelle 19, Anhang IX). Ebenso scheint die Wechselwirkung des C-terminus mit der Purinbase oder Resten in der Switch II Region vorteilhaft zu sein. Diese sollten daher auch in den Mimetika zu finden sein.
Versucht man, bei Verwendung der Struktur **B,** die Substituenten mit den Resten in PGPMG zu überlagern, resultiert eine Überlappung der blau markierten Atome mit Ala 83, Ser 89 oder Asn 86 von Ras. Das Grundgerüst **C** ist besser geeignet als **B**, das in Abbildung 42 gezeigte Mimetikum **A** imitiert die durch Prolin bedingte Konformation jedoch am Besten. Die erste Aminosäure war in der Split-Mix-Bibliothek kovalent an GTP gebunden. Für das Design eines Mimetikums wurde diese Aminosäure und der Spacer, wie beim Design der Split-Mix-Bibliothek beabsichtigt, durch eine Hydrolyse-fördernde Kopfgruppe ersetzt. In der vorgeschlagenen Struktur **97** findet die 2-Aminopyridylgruppe, die in der ersten Peptidbibliothek eingesetzt wurde, erneut Verwendung. Die magenta gefärbten Atome sollten in Analogie zum Arginin des GAP Proteins, durch Kompensation der Ladungen an β- und γ Phosphat eine Beschleunigung der GTP Hydrolyse bewirken. Die Bindung wird durch Wasserstoffbrücken zu den Phosphaten begünstigt (siehe Anhang IX). Die in Abbildung 41 blau markierten Atome sollten in dem eingangs beschriebenen hydrophoben „Patch“ auf der Ras Oberfläche in der Nähe der GTP Bindungstasche ebenso binden wie das zentrale Prolin von PGPMG. Die Wechselwirkung mit der Purinbase durch das freie Carboxylat wird beim vorgeschlagenen Peptidmimetikum durch die Seitenkette der Glutaminsäure übernommen. Der Bindungsbeitrag des Methionins erschließt sich nicht aus dem vorgeschlagenen Bindungsmodus. Daher sollte die Methylgruppe (grün markiert) im Peptidmimetikum variiert werden.

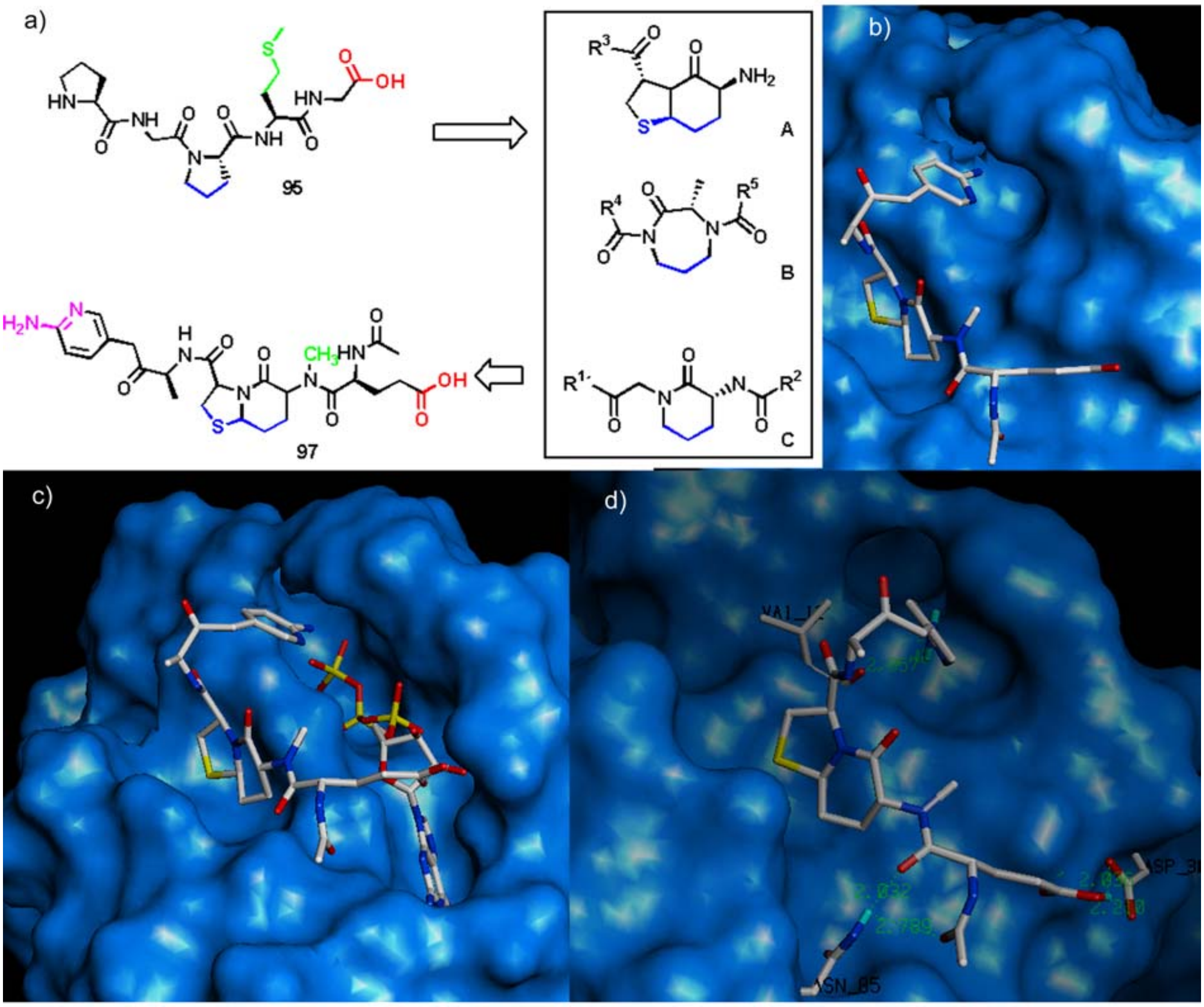


Abbildung 42: a) Ausgehend von 95 wurden verschiedene Grundgerüste für Peptidmimetika untersucht, b) Mimetikum 97, gebunden an Ras c) gleiche Ansicht wie b, GTP nicht unter der Oberfläche verborgen, d) Wechselwirkungen von Mimetikum 97 mit Ras*GTP.

4.2 Rezeptor-Tyrosin-Kinase Inhibitoren

4.2.1 Vorüberlegungen

Aus den in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Erfahrungen mit Staurosporin kann abgeleitet werden, dass von einem ATP kompetitiven Inhibitor, der nur die hochkonservierte ATP Bindungsstelle belegt, wenig Selektivität zu erwarten ist. Wie eingangs erwähnt, findet sich hinter der Purin-Bindungsstelle eine sehr variable hydrophobe Tasche. Die zahlreichen strukturellen Unterschiede machen diesen Bereich für die Entwicklung von selektiven Kinaseinhibitoren attraktiv. Die ersten Kristallstrukturen und Modelling Arbeiten von G. Bold et al.[134] zeigten, dass viele ATP kompetitive Kinase-Inhibitoren Wasserstoffbrücken zu Rückgrat Atomen in der Hinge Region bilden, wie sie auch vom Purin des ATP gebildet werden. Da von den hier untersuchten Kinaseinhibitoren die ATP kompetitive Wirkung vor Beginn der vorliegenden Arbeit nachgewiesen war, galt diese Wechselwirkung als einer der wichtigsten Anhaltspunkte bei der Analyse dieser Verbindungen.

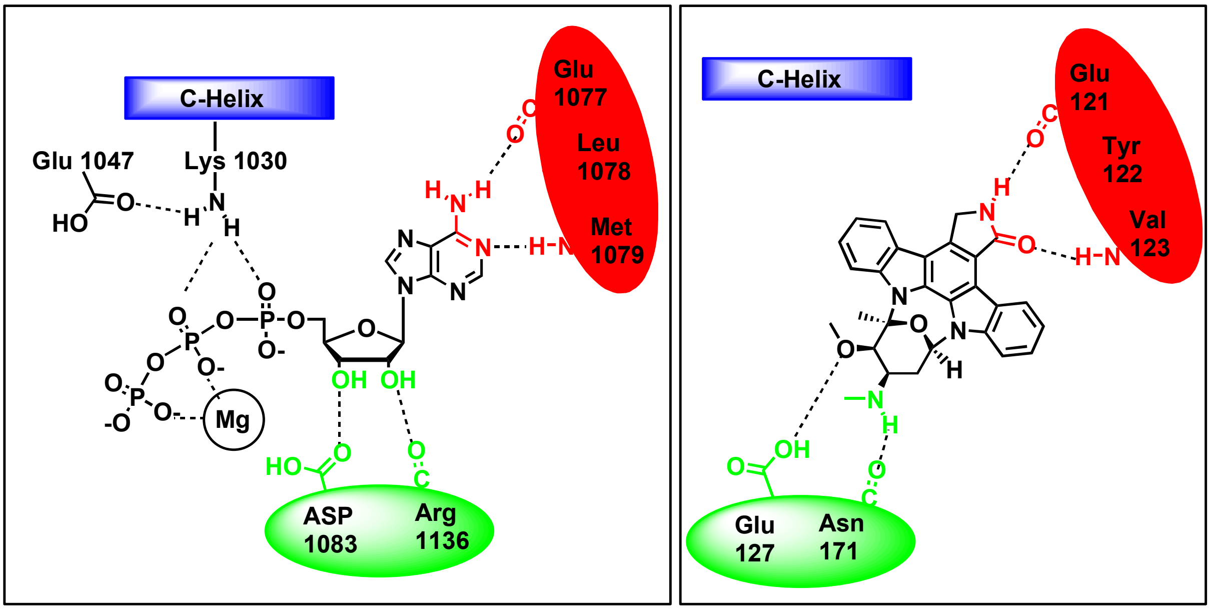


Abbildung 43: a) Wasserstoffbrücken zwischen IGF1R und ATP, b) Wasserstoffbrücken zwischen Staurosporin und PKA

4.2.2 Biologisch Validierter Startpunkt der Untersuchungen

Mit der erfolgreichen Totalsynthese des ErbB-2 Inhibitors Nakijichinon C **6** und der damit verbundenen synthetischen Zugänglichkeit struktureller Analoga war ein biologisch validierter Startpunkt für die Entwicklung neuer Rezeptor-Tyrosin-Kinase Inhibitoren gegeben.[135] Der in Abbildung 44 gezeigte marine Naturstoff Nakijiquinon C **6** und dessen C-2 Epimer **98** waren Ausgangspunkt dieser Untersuchungen. Nach seiner Isolierung aus einem Schwamm vor Okinawa, fiel Nakijiquinon C **6** durch eine Inhibition der ErbB-2 Rezeptor-Tyrosin-Kinase auf. Das C-2 Epimer **98** zeigt keine Aktivität gegen ErbB-2, inhibiert jedoch VEGFR-2 (IC_{50} = 18 µM).[136]

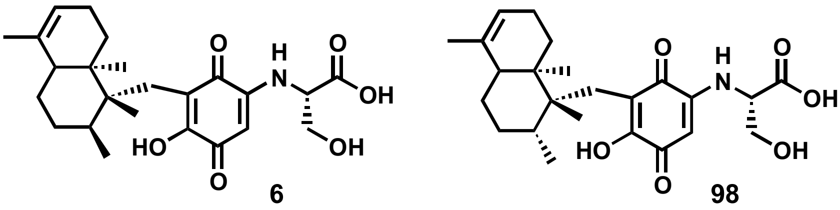


Abbildung 44: Strukturen des Naturstoffes Nakijichinon C und des C-2 Epimers

An die erfolgreiche Totalsynthese von Nakijichinon C schloss sich die Synthese einer kleinen Bibliothek von Analoga an.[136,137] Nakijichinon C **6** sowie diese Analoga wurden nachfolgend als potentielle ATP-kompetitive Inhibitoren von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in einem Fluoreszenz-basierten Assay untersucht. Von den 74 getesteten Verbindungen zeigten 7 eine Aktivität gegen verschiedene Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, teils mit ausgezeichneter Selektivität. Die inhibierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Erb-B2, Tie-2, VEGFR-2, VEGFR-3 und IGF1R sind aufgrund der eingangs erwähnten Schlüsselrolle in Signaltransduktionsprozessen von hohem Interesse. Voraussetzung für eine weitere Verbesserung dieser Inhibitoren ist eine Rationalisierung der beobachteten Aktivitätsmuster. Die Anwendung von Molecular Modelling setzt die Existenz einer geeigneten dreidimensionalen Struktur der Inhibitoren und Proteine voraus. Von den zu Beginn erwähnten Methoden der Röntgenstrukturanalyse, ab-initio Rechnungen, semi-empirische Rechnungen oder Geometrieoptimierungen durch Kraftfeldrechungen wurden für die Generierung der Inhibitorstrukturen semi-empirische Verfahren (AM1) und Kraftfeldrechnungen (CHARMM) ausgewählt. Da nicht für alle betrachteten Kinasen geeignete Röntgenstrukturen vorlagen, wurden diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels Homology Modelling generiert.

4.2.3 3D-Strukturen von Nakijichinon C und dessen Analoga

Von fünf biologisch aktiven und strukturell interessanten Verbindungen wurden zunächst dreidimensionale Strukturen erstellt. Gemäß AAV-MM1 wurden die Strukturen gezeichnet und mit CHARMM optimiert. Für das ungesättigte und mehrfach methylierte Dekalingerüst von **6** und **98** ist die Energie-minimale Konformation in Abbildung 45 gezeigt. Diese durch CHARMM-Kraftfeldrechnung erhaltenen Konformationen wurden durch AM1 Rechnungen bestätigt.[†††]

[†††] Die AM1 Rechnungen wurden auf einem PC (Intel Celeron 400 MHz, Windows 98) mit dem Programm „Hyperchem“ durchgeführt. Alle anderen Berechnungen wurden auf einer SGI O_2 Workstation bzw. einer Origin 2000 durchgeführt.

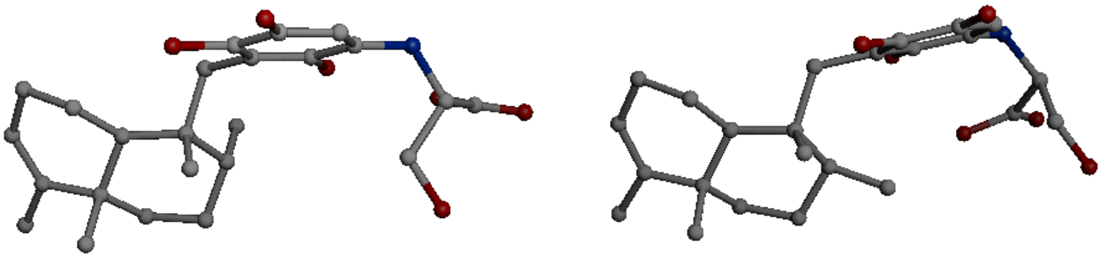
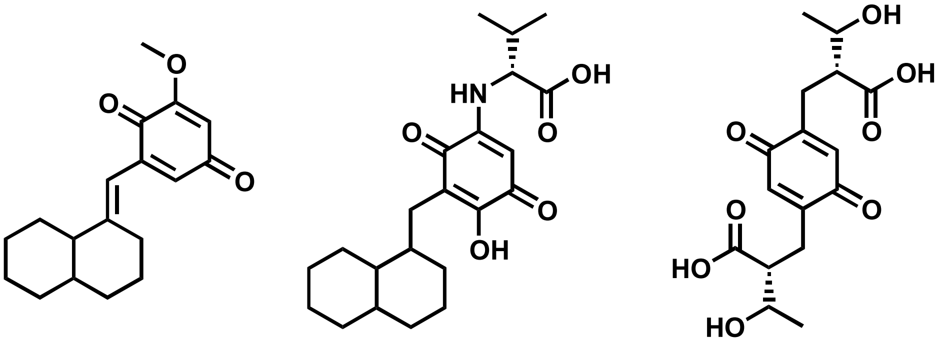


Abbildung 45: Konformationen von 98 (links) und 6 (rechts) nach CHARMM Minimierung (Wasserstoffatome sind nicht gezeigt)

Auffallend war die offenbar größere Einschränkung der Rotation um die Bindung zwischen dem Chinon und dem C-1 Atom des Dekalins. Hierfür könnte der sterische Anspruch der beiden benachbarten Methylgruppen verantwortlich sein. Sowohl Nakijichinon als auch das C-2 Epimer sind daher vergleichsweise starre Systeme. Bei beiden Substanzen liegt der ungesättigte Ring in einer Twist Konformation vor, der zweite Ring nimmt eine Sesselkonformation ein. Durch 1,3-diaxiale Wechselwirkungen der Methylgruppen im gesättigten Ring ist die Sesselform leicht verzerrt. Für die Verbindung **99** und **100** ist die Sessel-Sessel Konformation des trans-Dekalins unstrittig, die Verzerrung durch die exocyclische Doppelbindung bei **99** ist gering.



99 **100** **101**

Abbildung 46: Strukturen der biologisch aktiven Nakijichinon-Analoga

Ein Vergleich der CHARMM minimierten Geometrien mit den Resultaten der AM1 Berechnungen ergab eine weitgehende Übereinstimmung. Die Resultate sind als Kugel-Stab-Modelle in Abbildung 47 gezeigt.

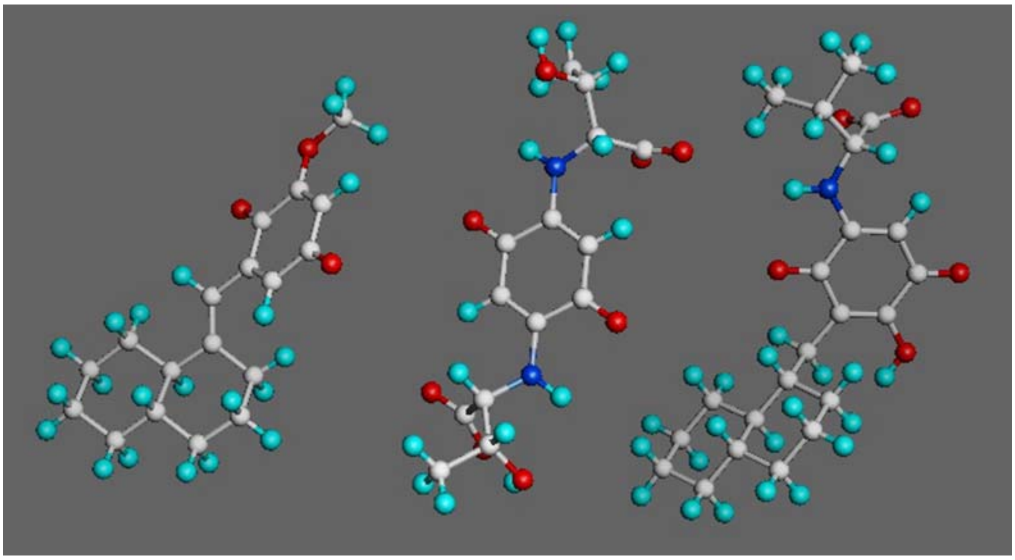


Abbildung 47: Kugel-Stab-Modelle der Verbindungen 99, 100 und 101 nach CHARMM Minimierung

Zweifelsohne liegen die genannten Verbindungen in zahlreichen Konformationen unterschiedlicher Energie vor. Für die weiteren Arbeiten ist es ein plausibler Ansatz mit Energie-minimalen Konformationen zu arbeiten, da diese einen signifikanten Anteil der Gesamtpopulation darstellen dürften. Die gemessenen IC_{50} Werte der Nakijichinon Analoga sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Verbindung	ErbB2	EGF	IGF1R	VEGFR-2	VEGFR-3	Tie-2
6	29	-	-	-	-	-
98	-	-	-	20	-	-
99	-	-	-	-	-	14
100	-	44	6	-	3	5
101	-	-	0,5	-	-	9

Tabelle 4: IC_{50} Werte der Kinaseinhibitoren.[‡‡‡]

[‡‡‡] Der Messung der IC_{50} Werte ging ein grobes Screening voraus. Nur die Verbindungen, die in diesem ersten Screening (durchgeführt von R. Mazitschek, Universität Karlsruhe) eine Aktivität aufwiesen, wurden hier genauer untersucht.

4.2.4 Konstruktion der Homologiemodelle

4.2.4.1 Vorüberlegungen

Zur vollständigen Erklärung der Aktivitäten und Selektivitäten von Nakijichinon C und dessen Analoga waren dreidimensionale Strukturen der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Tie-2, IGF1R, VEGFR-2 und VEGFR-3 und ErbB-2 erforderlich. Kristallstrukturen der Kinasedomänen der ersten drei genannten Proteine sind zwar bekannt, allerdings fehlt in den Tie-2 und VEGFR-2 Strukturen ein Ligand. Gemäß der in Kapitel 2.1.2.1 beschriebenen Konformationsänderungen bei der Bindung von Liganden macht diese Tatsache die Strukturen für Docking Experimente unbrauchbar. Im Falle der Tie-2 Kristallstruktur kommt zur offenen Konformation, und der durch die Verschiebung der C-Helix bedingten falschen Positionierung wichtiger Reste wie Lysin 855 und Glutaminsäure 872, auch noch eine vermutlich durch Packungseffekte bedingte autoinhibitorische Konformation des „*Nucleotide Binding Loops*" hinzu. In Abbildung 48 ist der rot eingefärbte Teil des *Nucleotide Binding Loops* in der Tie-2 Kristallstruktur (gelb) abgeknickt und die Purinbindungstasche wird durch einen Glutaminsäurerest im *Nucleotide Binding Loop* blockiert. Die Seitenketten von Glu 903, Tyr 904 und Ala 905 in der Hinge Region sind explizit gezeigt, ebenso die für die Koordination der β-Phosphatgruppe essentiellen und daher strikt konservierten Reste Lys 855 und Glu 872. Im Gegensatz zum Homologiemodell von Tie-2 (blau, Konstruktion siehe Kapitel 4.2.4.3) ist die Kristallstruktur für Docking Experimente unbrauchbar.

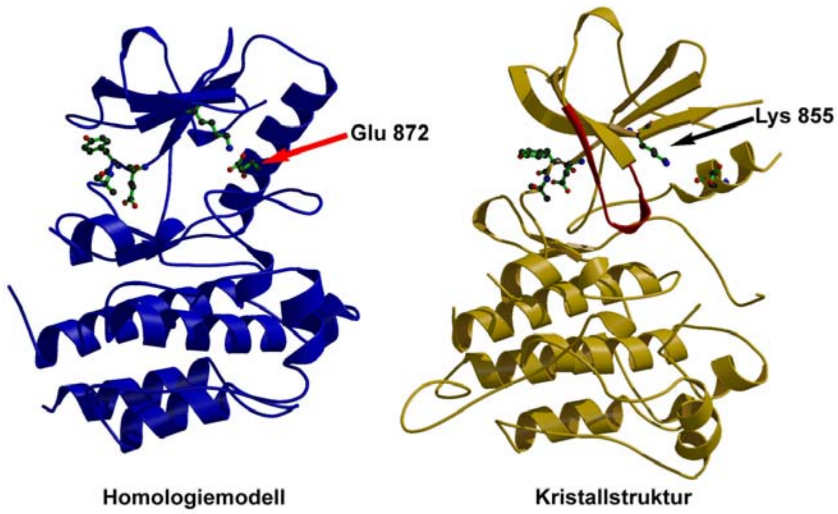


Abbildung 48: Modell der aktiven Form von Tie-2 (blau) und Kristallstruktur der inaktiven Form (gelb).

Im biologischen Test wurden anstelle der membrangebundenen Rezeptoren lediglich die als GST-Fusionsproteine exprimierten Kinasedomänen der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen verwendet. Eine Wechselwirkung der Inhibitoren mit extrazellulären oder trans-Membran Domänen

wurde nicht untersucht. Dies rechtfertigt es, für die vorliegende Arbeit Homologiemodelle der Kinasedomänen und nicht der gesamten Rezeptoren zu erstellen und zur Aufklärung der molekularen Ursachen der beobachteten Aktivitäten heranzuziehen. Für die Analyse der Nakijichinon Analoga mussten daher, abgesehen von der für Molecular Modelling Arbeiten geeigneten Struktur des IGF1R, Homologiemodelle für Tie-2, VEGFR-2, VEGFR-3 und Erb-B2 (auch HER-2/Neu genannt) erstellt werden.

4.2.4.2 Auswahl von Templatstrukturen

Da die Qualität des Homologiemodells auch von der Wahl des geeigneten Templates abhängt, wurde zunächst untersucht, welche der zugänglichen Kristallstrukturen aktivierter Kinasen verwendet werden könnten. Die Einteilung der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in Familien erfolgt wie eingangs erwähnt nach dem Aufbau der extrazellulären Domäne. Da diese für die vorliegende Arbeit nicht von Interesse ist, wurden die Templatstrukturen anhand maximaler Sequenzhomologie innerhalb der Kinasedomänen ausgewählt. Von den kristallisierten Kinasen mit hinreichend hoher Ähnlichkeit zu den gegebenen Primärsequenzen, liegen von der Kinasedomäne des FGF1 Rezeptors und des IGF1 Rezeptors Strukturen vor, welche die Kinase in einem aktivierten Zustand zeigen.

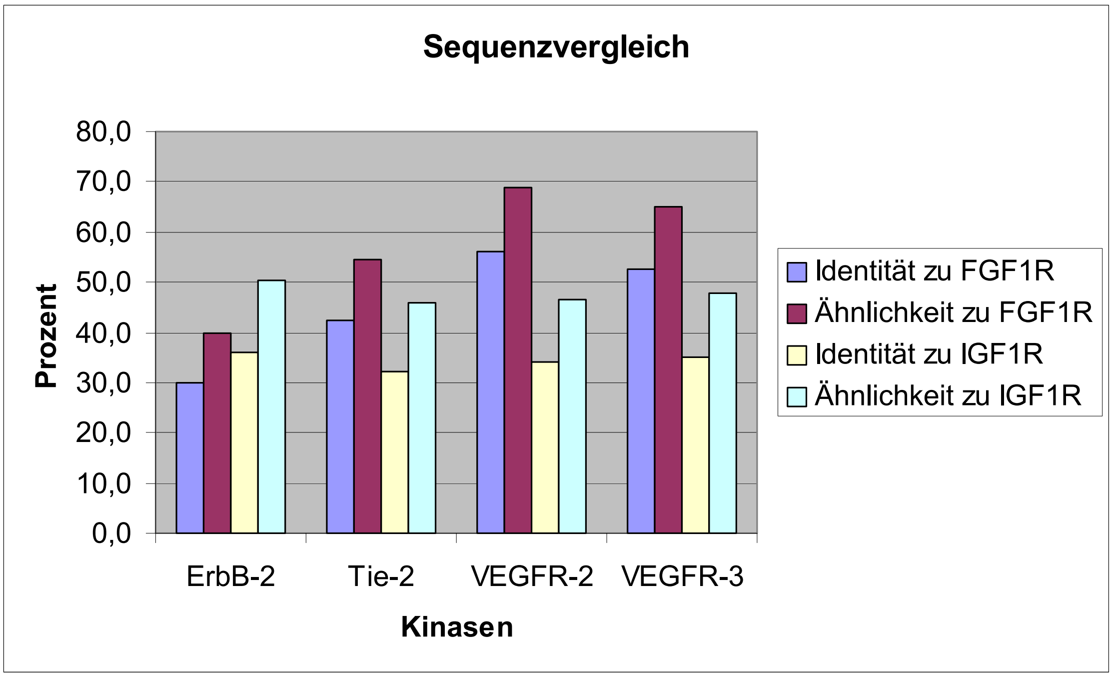


Abbildung 49: Vergleich der Primärsequenzen von ErbB-2, Tie-2, VEGFR-2, VEGFR-3 mit den Templatsequenzen der IGF1 und FGF1 Rezeptoren

Mit dem Programm BLAST[81] wurden für Primärsequenzen der Kinasedomänen von Tie-2, VEGFR-2, VEGFR-3 und ErbB-2 die prozentuale Identität und Ähnlichkeit, jeweils zur Kinasedomäne des FGF1 Rezeptors und IGF1 Rezeptors errechnet. Für die Konstruktion verlässlicher Homologiemodelle gilt ein Wert von 30 % als untere Grenze,[138] so dass beide Strukturen für alle Modelle als Template denkbar wären. Für das Modell der Kinasedomäne

von ErbB-2 wurde die Struktur des IGF1 Rezeptors aufgrund des größeren Identitäts- und Ähnlichkeitsgrades ausgewählt. Aufgrund der jeweils etwas größeren Ähnlichkeit zu FGF1R wurde für Tie-2, VEGFR-2 und VEGFR-3 jedoch der FGF Rezeptor 1 als Templat für die Konstruktion der Homologiemodelle gewählt. Diese Wahl wird auch dadurch bestätigt, dass FGF1R bei der Lösung der Kristallstruktur von VEGFR-2 als Search Modell gedient hat.[139] Der gleichen Argumentation folgten unabhängig von diesen Arbeiten auch G. Bold et al.[134] Vom FGF1 Rezeptor sind mehrere Kristallstrukturen in der PDB deponiert. Der Vergleich der Kristallstrukturen des FGF1R ohne Ligand (PDB-Code 1FGK) mit den Strukturen mit Liganden (PDB-Code: 1FGI und 2FGI) belegt erneut die Konformationsänderungen als Konsequenz der Bindung eines Liganden, allerdings ist das Ausmaß der Änderungen von der Art und Struktur des Liganden abhängig. Die beiden von M. Mohammadi et al. gelösten Strukturen des FGF1R im Komplex mit Inhibitoren sind in Abbildung 50 gezeigt.[22,140] Die sogenannte C-Helix, der *Activation Loop* und der *Nucleotide Binding Loop* zeigen eine ausgeprägte Flexibilität, die deutlich unterschiedlichen Konformationen des *Nucleotide Binding Loops* sind in Abbildung 50 farbig hervorgehoben.

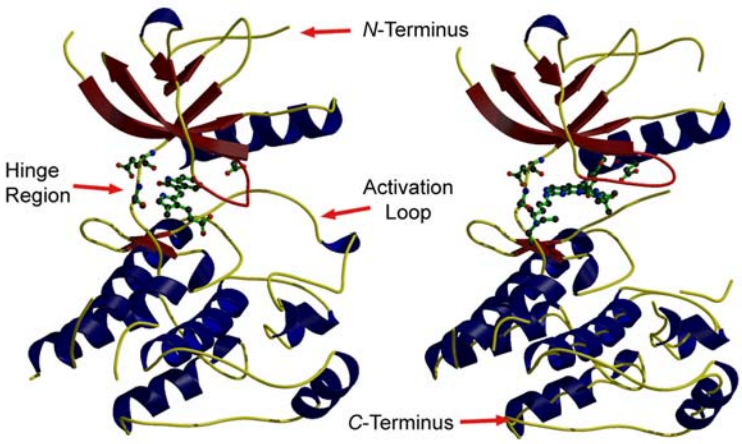


Abbildung 50: Kristallstrukturen der Kinasedomäne des FGF1 Rezeptors mit Sugen (links) und Parke-Davis (rechts) Inhibitoren. Der flexible Teil des Nucleotide Binding Loop ist Rot eingefärbt.

Dies belegt die Bedeutung des "induced fit" Konzeptes, insbesondere bei der Arbeit mit hochflexiblen Strukturen, wie den Kinasedomäne der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Die Konformation der Kinasedomäne ändert sich nach Bindung eines Liganden, wobei das Ausmaß der Änderung von der Struktur des Liganden (ATP oder ein Inhibitor) stark abhängig ist. Diese Erkenntnis führte zur Aufstellung der Arbeitshypothese, dass die Konstruktion verschiedener Homologiemodelle auf Basis beider FGF1R Strukturen für eine Analyse der Inhibitoren von Nakijichinon-Typ vorteilhaft sein könnte. Nach der Veröffentlichung erster Resultate, wurde eine ähnliche Hypothese auch von A. J. Brigdes (Head of Cancer Research, Pfizer Inc.) propagiert. Er geht ebenfalls davon aus, dass sehr aktive Inhibitoren einen hydrophoben Kollaps um den Inhibitor herum begünstigen.[19]

Die teils deutlichen Unterschiede der Kristallstrukturen der inaktiven Kinasen Tie-2 und VEGFR-2 bzw. FGF1R könnte Anlass sein, die Wahl des Templats in Frage zu stellen. Die in der vorliegenden Arbeit gemachte Annahme, dass der konservierte Bindungsmodus von ATP vergleichbare Konformationen der aktivierten Kinasen bedingen würde, war auch Basis anderer Arbeiten zur Erstellung von Kinasemodellen und auch dort von Erfolg gekrönt.[134]

4.2.4.3 Konstruktion der Homologiemodelle von VEGFR-2, VEGFR-3 und Tie-2: Einsatz des FGF1 Rezeptors als Templat

Die Homologiemodelle für Tie-2 und VEGFR-2 und VEGFR-3 konnten nun auf Basis beider FGF1R Kristallstrukturen mit Inhibitoren[141] erstellt werden. Die Primärsequenzen für Tie-2, VEGFR-2 und VEGFR-3 wurden der „SwissProt-Database" entnommen. Die Primärsequenzen sind dort unter folgenden "primary accession numbers" gespeichert: P35968 (VEGFR-2), P35916 (VEGFR-3) und Q02763 (Tie-2). Das Alignment mit den Templatsequenzen wurde zunächst mit dem DIALIGN Algorithmus durchgeführt.[82] Insbesondere in SVR Bereichen führte der Einsatz dieses Alignments aufgrund größerer „Restraints" (siehe Kapitel 2.3.3.2.2) zu schlechteren Modellen. Daher wurde das Alignment manuell korrigiert und der Zyklus aus Alignment und Modellkonstruktion so lange wiederholt, bis diese Fehler minimiert und nahezu alle Reste nach einer Analyse durch WHATCHECK in „erlaubten" Bereichen des Ramachandran-Plots lagen. Die hochkonservierten Bereiche im *Nucleotide Binding Loop* sowie das in der Katalyse involvierte HRDLAARN Motif wurden dabei als Fixpunkte betrachtet und die Sequenzlücken zwischen diesen Fixpunkten verschoben. Das Alignment der Primärsequenzen, wie es in Abbildung 51 gezeigt ist, führte schließlich zu den besten Modellen. Das 3D Modell wurde auf Basis dieses Alignments mit dem Programm MODELLER 4.0 erstellt.[138] Die Fehlersuche in den Modellen, insbesondere die Analyse der Konformationen der Seitenketten wurde durch die Anwendung der WHATCHECK Software vereinfacht. Korrekturen der Primärmodelle wurden auf Basis der WHATCHECK Analyse manuell in WitnotP durchgeführt (AAV-MM20) bis alle relevanten Werte im gewünschten Bereich lagen. Die *Kinase Insert Domain* wurden zur Vereinfachung der Arbeiten gelöscht, da dieser Bereich in den Kinasen stark divergiert und für die Analyse von ATP-kompetitiven Inhibitoren aufgrund der großen Distanz zwischen ATP Bindungstasche und KID uninteressant ist. Die hier betrachteten Kinasedomänen umfassen ca. 300 Aminosäuren. Es gilt als akzeptabel bzw. realistisch wenn ca. 5 % der Aminosäuren außerhalb der „erlaubten" Bereiche liegen.[142,143] Die von WHATCHECK generierten Ramachandran Plots sowie die Zusammenfassungen der einzelnen Analysen sind in Anhang V aufgeführt. Die fehlenden Wasserstoffatome wurden in WitnotP hinzugefügt. Der Algorithmus, der diese Addition von Wasserstoffatomen an Strukturen durchführt, geht rein nach geometrischen Gesichtspunkten vor. Eine Berücksichtigung von Wasserstoffbrücken findet bei der Ausrichtung, z. B. von OH-Gruppen nicht statt. Daher ist in der Regel eine Kraftfeld-Energieminimierung sinnvoll. Bei diesen

Homologiemodellen zeigte sich jedoch, dass eine Minimierung in Abwesenheit von Inhibitoren im aktiven Zentrum zu einem Kollaps der ATP-Bindungstasche in Abwesenheit von Inhibitoren führte. Daher wurden zunächst nur Seitenketten minimiert (siehe AAV-MM9). Vollständige Minimierungen (AAV-MM3 oder AAV-MM5) wurden erst nach manuellem Docking von Inhibitoren in das aktive Zentrum durchgeführt.

```
FGF1-R        EDPRWELPRDRLVLGKPLGEGAFGQVVLAEAIGLPNRVTKV--AVKMLKSDATEKDLSDL
Tie-2         TIYPVLDWNDIKFQD-VIGEGNFGQVLKARIKKDGLRMD-A--AIKRMKEYASKDDHRDF
VEGFR-2       DASKWEFPRDRLKLGKPLGRGAFGQVIEADAFGIDKTATCRTVAVKMLKEGATHSEHRAL
VEGFR-3       DASQWEFPRERLHLGRVLGYGAFGKVVEASAFGIHKGSSCDTVAVKMLKEGATASEHRAL

FGF1-R        ISEMEMMKMIGKHKNIINLLGACTQ-DGPLYVIVEYASKGNLREYLQARRPPEEQ-----
Tie-2         AGELEVLCKLGHHPNIINLLGACEH-RGYLYLAIEYAPHGNLLDFLRKSRVLETDPAFAI
VEGFR-2       MSELKILIHIGHHLNVVNLLGACTKPGGPLMVIVEFCKFGNLSTYLRSKRNEFVEDLYKD
VEGFR-3       MSELKILIHIGNHLNVVNLLGACTKPQGPLMVIVEFCKYGNLSNFLRAKRDAFS------

FGF1-R        -------LSSKDLVSCAYQVARGMEYLASKKCIHRDLAARNVLVTEDNVMKIADFGLARD
Tie-2         ANSTASTLSSQQLLHFAADVARGMDYLSQKQFIHRDLAARNILVGENYVAKIADFGLSRG
VEGFR-2       F------LTLEHLICYSFQVAKGMEFLASRKCIHRDLAARNILLSEKNVVKICDFGLARD
VEGFR-3       -------LTMEDLVCYSFQVARGMEFLASRKCIHRDLAARNILLSESDVVKICDFGLARD

FGF1-R        IHHIDYYKKTTNGRLPVKWMAPEALFDRIYTHQSDVWSFGVLLWEIFTLGGSPYPGVPVE
Tie-2         QEV---YVKKTMGRLPVRWMAIESLNYSVYTTNSDVWSYGVLLWEIVSLGGTPYCGMTCA
VEGFR-2       IYKDPDYVRKGDARLPLKWMAPETIFDRVYTIQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGVKID
VEGFR-3       IYKDPDYVRKGSARLPLKWMAPESIFDKVYTTQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGVQIN

FGF1-R        ELF-KLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDL
Tie-2         ELY-EKLPQGYRLEKPLNCDDEVYDLMRQCWREKPYERPSFAQILVSL
VEGFR-2       EEFCRRLKEGTRMRAPDYTTPEMYQTMLDCWHGEPSQRPTFSELVEHL
VEGFR-3       EEFCQRLRDGTRMRAPELATPAIRRIMLNCWSGDPKARPAFSELVEIL
```

Abbildung 51: Alignment der Primärsequenzen von FGF1-R, Tie-2 (TEK) und VEGFR-2 (KDR) und VEGFR-3. Konservierte Reste sind rot gefärbt, identische Reste sind grün gekennzeichnet und ähnliche Aminosäuren sind gelb hinterlegt.

Die Ramachandran-Plots der Homologiemodelle (siehe Anhang I) zeigen, dass über 95 % der Aminosäuren sich in den erwarteten Bereichen befinden. Diese Werte stimmen mit denen guter Kristallstrukturen bzw. Homologiemodelle überein. Keine der Aminosäuren, die mit den ATP-kompetitiven Inhibitoren interagieren, liegt außerhalb der „erlaubten" Bereiche im Ramachandran Diagramm.

Schwierig ist die Bestimmung der exakten Konformation von Teilen des *Activation Loop*. Die Aminosäuren diese Teils der Kinasedomäne fehlen teilweise in den Templatstrukturen,

aufgrund einer geringen Ordnung im Kristall. Dies ist vermutlich auf die hohe Flexibilität dieses Teils der Kinasedomäne zurückzuführen. Aus zahlreichen Kristallstrukturen von Kinasedomänen ist bekannt, dass die *Activation Loops* der verschiedenen Kinasen recht unterschiedliche Konformationen annehmen. Das Modelling dieses Loops auf Basis der Analogie zu einem (hier unvollständigen) Templat ist daher mit Vorsicht zu genießen. Der Anfang dieses Loops, die auch an der Katalyse beteiligte, hochkonservierte DFG Sequenz, [23], ist in den Homologiemodellen sicher korrekt. Gleiches gilt für das ebenfalls konservierte Ende mit der Sequenz $X_1X_2RLPX_3X_4WMA$. Die Aminsäuren RLP und WMA sind hochkonserviert, dazwischen gibt es deutliche Unterschiede. Der Rest ist allerdings von der ATP Bindungstasche und der hydrophoben Tasche so weit entfernt, dass eine Modellierung nichts zur Betrachtung der ATP-kompetitiven Inhibitoren beitragen kann. Ein de-novo Loop Modelling[144] ist zwar möglich, für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse von ATP-kompetitiven Inhibitoren jedoch unbedeutend, da einerseits Deletionsmutanten von Kinasen ohne *Activation Loop* ein normale Aktivität zeigen und lediglich regulatorische Prozesse gestört sind[21] und andererseits dieser Loop an der Erkennung und Bindung der von den Kinasen phosphorylierten Peptidsequenz beteiligt ist, und daher die Struktur lediglich für die Entwicklung von Bisubstratinhibitoren von Interesse sein dürfte.[15] Für die Analyse der Bindungsmodi der ATP kompetitiven Nakijichinon-Analoga blieb daher der mittlere Teil der *Activation Loops* unberücksichtigt.

4.2.4.4 Homologiemodell von ErbB-2: Einsatz des IGF1 Rezeptors als Templat

In vollkommener Analogie zu der für die Homologiemodelle von VEGFR-2, VEGFR-3 und Tie-2 beschriebenen Vorgehensweise, wurde auch das Modell für die Kinasedomäne der ErbB-2 Rezeptor-Tyrosin-Kinase erstellt.[§§§] Das nach manueller Korrektur hierfür verwendete Alignment mit der Primärsequenz des IGF1 Rezeptors ist in Abbildung 52 gezeigt. Als dreimensionales Templat diente die IGF1R Struktur der Kinasedomäne im Komplex mit AppNHp und einem Tyrosinpeptid (PDB Code 1IR3). Auch in diesem Modell wurden KID und *Activation Loop* nicht durch de-novo Modelling berechnet, da dies zur Aufklärung der Bindungsmodi nicht erforderlich war.

[§§§] Die Primärsequenz der Kinasedomäne enstammt der SwissProt Dababase (Primary Accession Number P04626).

```
IGF1R      SSVFVPDEWEVSREKITLLRELGQGSFGMVYEGNARDIIKGEAETRVAVKTVNESASLRE
ErbB-2     LRK---------------VKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIP-VAIKVLRENTSPKA

IGF1R      RIEFLNEASVMKGFTCHHVVRLLGVVSKGQPTLVVMELMAHGDLKSYLRSLRPEAENNPG
ErbB-2     NKEILDEAYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQL-VTQLMPYGCLLDHVRENRGRLGSQDL

IGF1R      RPPPTLQEMIQMAAEIADGMAYLNAKKFVHRDLAARNCMVAHDFTVKIGDFGMTRDIETD
ErbB-2     LNWCMQ---------IAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDID

IGF1R      RK-----GGKGLLPVRWMAPESLKDGVFTTSSDMWSFGVVLWEITSLAEQPYQGLSNEQV
ErbB-2     ETEYHADGGK--VPIKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREI

IGF1R      LKFVMDGGYLDQPDNCPERVTDLMRMCWQFNPKMRPTFLEIVNL
ErbB-2     PDLLEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSE
```

Abbildung 52: Alignment der Primärsequenzen von ErbB-2 und IGF1R

Auch das Homologiemodell der ErbB-2 Rezeptor-Tyrosin-Kinase wurde im bereits beschriebenen Verfahren rekursiv optimiert. Im Ramachandran Diagramm (Anhang V) sind weniger als 5 % der Aminosäuren außerhalb der erwarteten Bereich. Ribbon-Diagramme der hier erstellten Homologiemodelle von Tie-2, VEGFR-2, VEGFR-3 und ErbB-2 sind in Anhang IV gezeigt.

4.2.4.5 Analyse der strukturellen Differenzen

Die fertiggestellten Homologiemodelle der Kinasedomänen erlaubten nun die Analyse struktureller Differenzen und deren Konsequenzen für die inhibitorische Aktivität der getesteten Kinaseinhibitoren. Die in einem Abstand von maximal 8 Å von ATP gefundenen Substitutionen sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Der geringe Selektionsdruck auf die Reste in der hydrophoben Tasche spiegelt sich in der Tabelle wieder, da fast alle Substitutionen in diesem Bereich zu finden sind. Die Nummerierung der Aminosäuren in den Homologiemodellen bezieht sich auf die Nummerierung der Primärsequenzen, wie sie in der Swissprot Database aufgeführt sind. Auffällig ist zunächst die vollkommene Identität von VEGFR-2 und VEGFR-3 im Bereich der ATP Bindungstasche. Lediglich im Nucleotide Binding Loop, am C-terminalen Ende und in Teilen des Activation Loops ($X_1X_2RLPX_3X_4WMA$ Sequenz) finden sich Substitutionen, was im Einklang mit der in Kapitel 2.1.2.1 erwähnten selektiven Bindung von Downstream Effektoren in diesem Bereich steht. Die bei Verbindung 100 beobachtete Selektivität zwischen VEGFR-2 und VEGFR-3 bei gleichzeitig fehlender Selektivität zwischen IGF1R und Tie-2 ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert und wurde sorgfältig analysiert.

Nummer	IGF1R	VEGFR-2	VEGFR-3	Tie-2	ErbB-2
1	Leu 1002	Leu 840	Leu 851	Ile 830	Leu 726
2	Met 1076	Val 916	Val 927	Ile 902	Thr 794
3	Val 1060	Val 899	Val 910	Ile 886	Ser 779
4	Val 1065	Val 914	Val 925	Leu 900	Ile 784
5	Phe 1054	Ile 892	Ile 903	Leu 879	Val 773
6	Met 1051	Leu 889	Leu 900	Leu 876	Met 770
7	Val 1050	Ile 888	Ile 899	Val 875	Val 769
8	Met 1079	Cys 919	Cys 930	Ala 905	Met 797
9	Met 1139	Leu 1035	Leu 983	Leu 971	Leu 833
10	Gly 1149	Cys 1045	Cys 993	Ala 981	Thr 843
11	Gln 1004	Arg 842	Tyr 853	Glu 832	Ser 728
12	Ser 1006	Ala 844	Ala 855	Asn 834	Ala 730
13	Glu 1001	Pro 839	Val 850	Val 829	Val 725
14	Gly 1168	Asp 1064	Ser 1012	Met 1012	Val 862
15	Asp 1083	Asn 923	Asn 937	Asn 909	Cys 801

Tabelle 5: Aminosäure Substitutionen innerhalb der Kinasedomänen, die für die vorliegende Analyse bedeutsam sind.

Neben den hier aufgeführten Substitutionen könnten auch die Differenzen im Nucleotide Binding Loop (Zeile 12 und 13) eine Rolle bei den beobachteten Selektivitäten spielen. Ein sehr interessantes Merkmal der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen der EGF Familie, zu denen Her-2/Neu (ErbB-2) gehört ist ein Cystein, dass die 2' Hydroxylgruppe von ATP koordiniert. An dieser Stelle findet sich in den anderen Rezeptor-Tyrosin-Kinase Famlien ein Asparagin oder Asparaginsäure (Zeile 15). Diese Merkmal wurde von Pfizer und Wyeth-Ayerst genutzt um irreversible Kinaseinhibitoren zu konstruieren die ein Michael-System entsprechend positionieren. Ob das Toxizitätsprofil dieser Verbindungen einen klinischen Einsatz zulässt wird gegenwärtig geprüft.[19] Für die bisher synthetisierten und hier untersuchten Inhibitoren spielt diese Substitution jedoch keine Rolle.

4.2.5 Aufklärung der Bindungsmodi

Zur Ermittlung der Bindungsmodi, als Voraussetzung der Bestimmung molekularer Ursachen für experimentell bestimmte Aktivität, kann man entweder auf automatische Docking Programme wie GOLD oder FlexX zurückgreifen, oder manuell vorgehen – der sogenannte wissensbasierte Ansatz.[145] Der Vorteil automatischer Docking Programme liegt zum Einen in der hohen Geschwindigkeit mit der zahlreiche Liganden an einen Rezeptor gedockt werden können (*in silico screening*), und zum Anderen kann aufgrund integrierter Scoring Funktionen

auch eine relativ objektive Bewertung (in Anbhängigkeit von der Person, die die Scoring Funktion erstellt hat!) verschiedener Inhibitoren durchgeführt werden. Als Validierung für die Resultate eines automatischen Dockings gilt ein linearer Zusammenhang der Bewertung mit den IC_{50} Werten. Daher wurde mit den minimierten Strukturen der interessantesten Mitglieder der Nakijichinon-Bibliothek ein automatisches Docking mit GOLD durchgeführt. Als Rezeptor diente das Homologiemodell „A" des VEGFR-2. Ein linearer Zusammenhang wurde nicht gefunden (Korrelationskoeffizient IC_{50}/Gold Score = -0,23). Auch wird z. B. für Verbindung **101** ein nicht sehr wahrscheinlicher Bindungsmodus am Besten bewertet. Hier findet sich die Carboxylatgruppe in der hydrophoben Tasche und das Dekalinsystem in der Purinbindungstasche. Anstelle eines Bindungsmodus, der mit experimentellen Daten in Einklang zu bringen ist, scheint GOLD hier mehr ein „Shape-Fit" zu produzieren. Auch werden beim Ermitteln der gebundenen Konformation nur Rotationsfreiheitsgrade der Inhibitoren berücksichtigt.[86] Die Proteinatome werden jedoch als starre Massepunkte behandelt GOLD dockt die Liganden/Inhibitoren nicht an das gesamte Protein, sondern „extrahiert" aus der vorgegebenen Struktur zunächst nur die „active atoms" in einem vordefinierten Radius um das aktive Zentrum herum und führt die Berechnungen nur mit diesen Atomen in fixierten Positionen durch.[85] Genau die Annahme eines relativ starren Proteins führt bei hochflexiblen Enzymen wie Kinasen zu Problemen. Daher wurde für dieses Projekt die weitere Arbeit manuell durchgeführt.

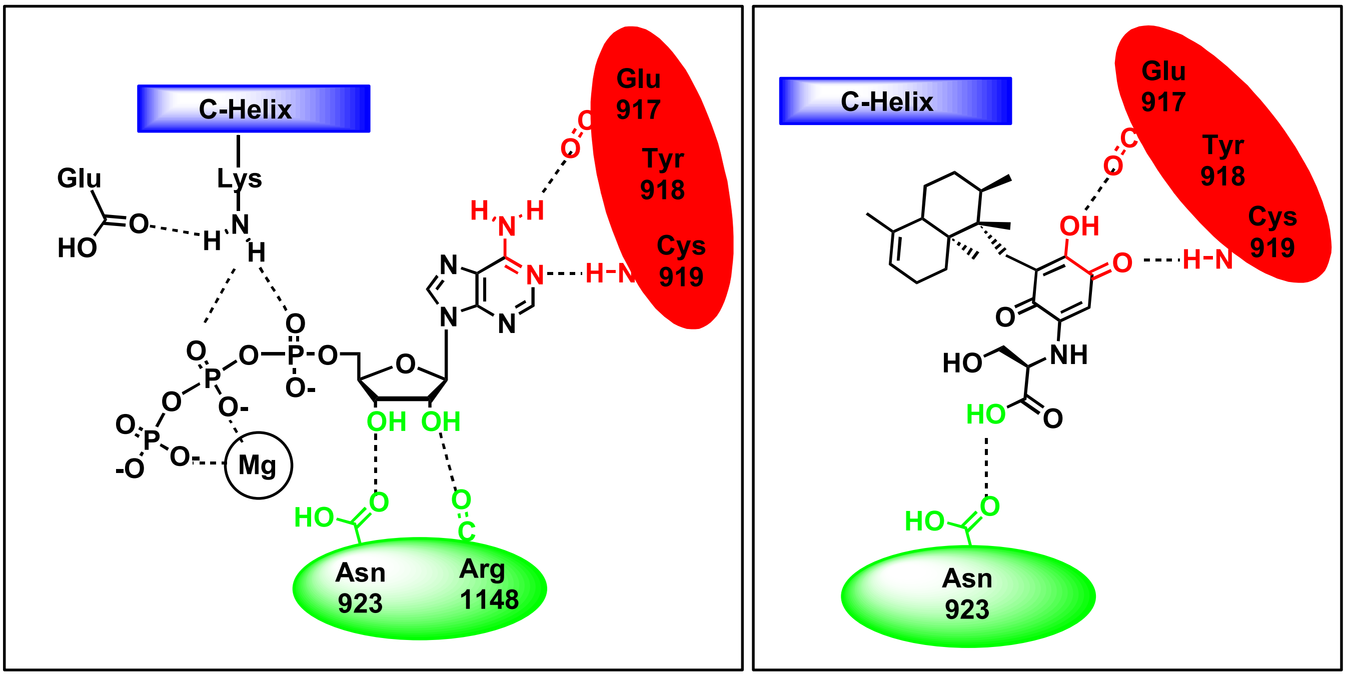


Abbildung 53: Nakijichinon C und die biologisch aktiven Analoga könnten ähnlich an die Rezeptor Tyrosin Kinasen binden wie ATP.

Erster Ansatzpunkt für die Bestimmung der Bindungsmodi, war die Möglichkeit der Ausbildung der gleichen Wasserstoffbrücken zur Hinge Region, wie diese von ATP gebildet werden (siehe Abschnitt 4.2.1). Die daraus resultierende grobe Orientierung von Nakijichinon im aktiven Zentrum von VEGFR-2 ist beispielhaft in Abbildung 53 dargestellt.

Weitere Ansatzpunkte für die Position der Nakijichinone und deren Analoga im aktiven Zentrum einer Kinase ergab sich aus einer Betrachtung der Hydrophobizität der Oberfläche. Die Oberflächen der Rezeptor-Tyrosin-Kinase in Abbildung 54 wurde gemäß AAV-MM16 mit HYDROMAP erstellt. Hinter dem aktiven Zentrum von ErbB-2 (hier exemplarisch ausgewählt) findet sich eine grün/grau eingefärbte hydrophobe Tasche. Die weißen Kugeln stellen berechnete Interaktionspunkte für lipophile Wechselwirkungen dar.Aus dem Vergleich der beiden Hydrophobizitätskarten leitet sich die Arbeitshypothese ab, das Dekalingerüst der Inhibitoren in der hydrophoben Tasche zu platzieren. Das Muster der Wasserstoffbrücken sowie die Position des Dekalingerüsts in der hydrophoben Tasche waren die Grundlagen des in der vorliegenden Arbeit verfolgten „wissensbasierten Ansatzes“ zur Aufklärung der Bindungsmodi der Nakijichinon-Analoga

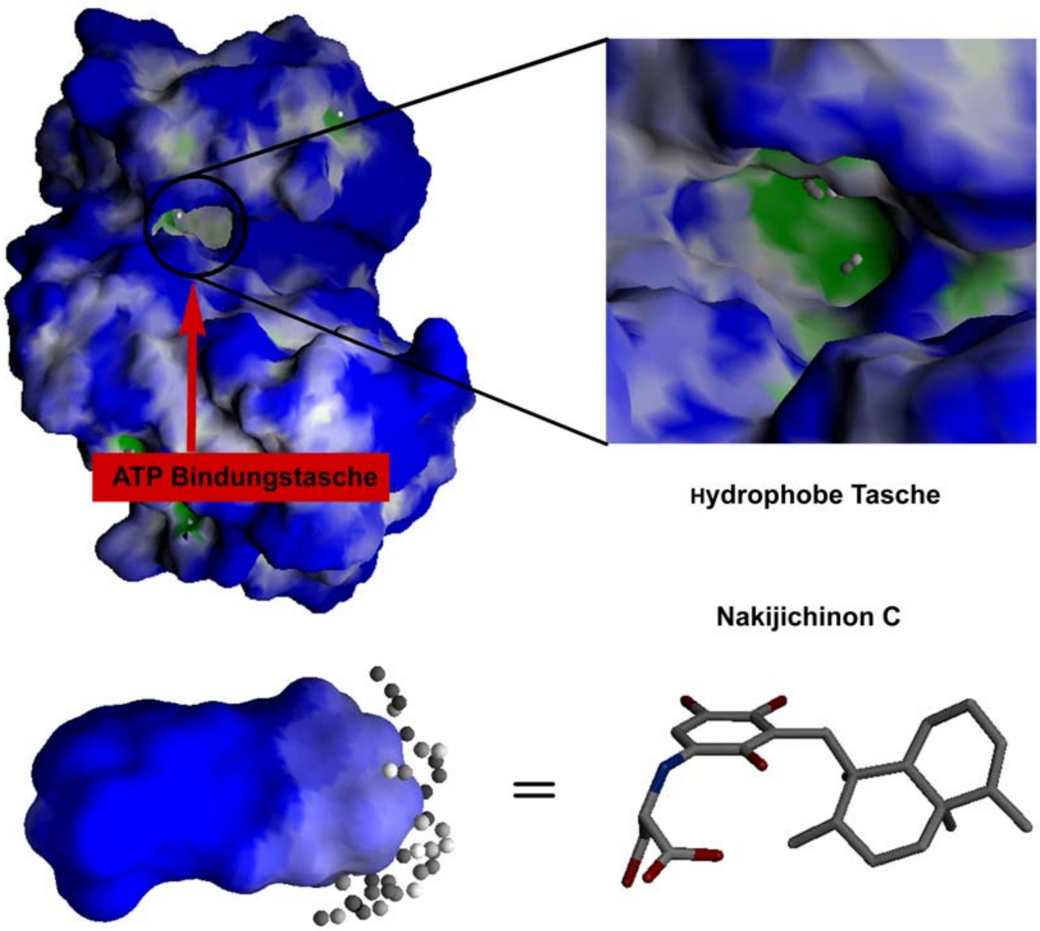


Abbildung 54: Hydrophobizitätskarte von ErbB-2 (links oben). Hervorgehoben ist die hydrophobe Tasche hinter der ATP Bindungsstelle. Aus der Struktur von Nakijichinon C und dessen Hydrophobizitätskarte wird der „Fit“ des Naturstoffes in die Tasche verdeutlicht. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind keine Wasserstoffatome gezeigt.

4.2.5.1 Wechselwirkung von Nakijichinon C (6) und dessen C-2 Epimer (98) mit ErbB-2 und VEGFR-2

Zu den interessantesten Resultaten der biologischen Evaluierung von Nakijichinon C und dessen Analoga gehört sicherlich die Inhibition von ErbB-2 durch den Naturstoff und die Inhibition von VEGFR-2 durch das C-2 Epimer, wobei die beiden Epimere jeweils vollständig selektiv für eine der beiden Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sind. Nakijichinon C und dessen C-2 Epimer konnten mit den vorliegenden Homologiemodellen manuell in die aktiven Zentren gedockt werden. Wie aus Abbildung 55 ersichtlich, passt das substituierte Dekalingerüst von **98** in die von Val 916, Val 914, Val 899, Leu 889, Cys 1045 und Phe 1047 begrenzte hydrophobe Tasche von VEGFR-2. Der L-Serin Teil des Moleküls trägt durch Wasserstoffbrücken zu Leu 840 und Asn 923 zur Bindung und korrekten Orientierung des Inhibitors bei. Asn 923 steuert bei der Bindung des natürlichen Substrates ATP eine Wasserstoffbrücke zur 2'-OH Gruppe der Ribose bei. In dem hier vorgeschlagenen Bindungsmodus tragen die phenolische OH Gruppe sowie eine der Chinon-Carbonylgruppen durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Glu 917 und Cys 919 zur Bindung bei. Diese Wasserstoffbrücken zur Hinge-Region werden, wie in Abbildung 54 gezeigt, auch vom Purinrest des ATPs ausgebildet. Der hier vorgeschlagene Bindungsmodus befindet sich daher in vollem Einklang mit den experimentellen Daten, die eine ATP kompetitive Inhibition von VEGFR-2 durch das C-2 Epimer von Nakijichinon C bzw. von ErbB-2 durch den Naturstoff belegen.

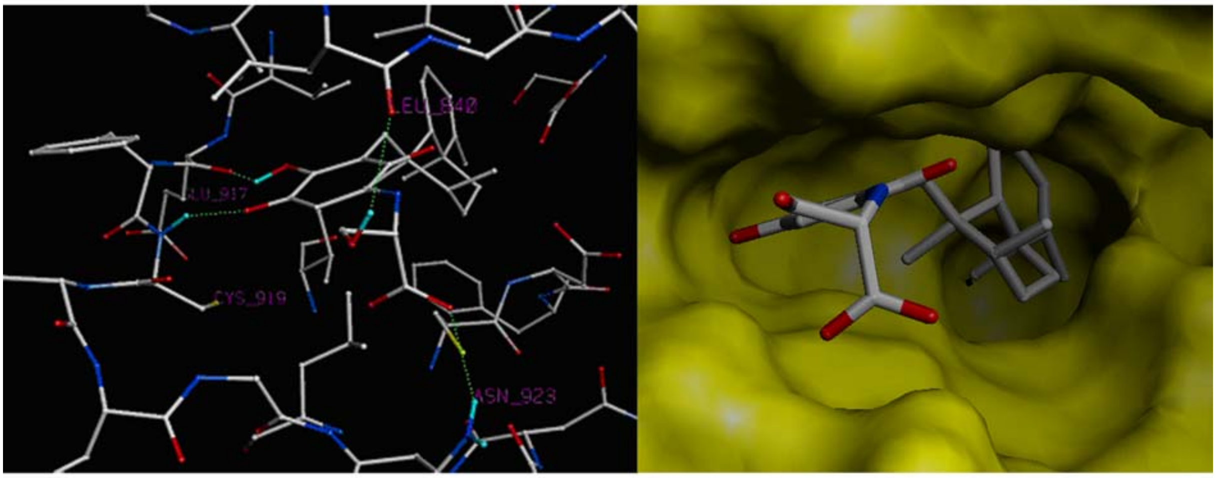


Abbildung 55: Verbindung 98 im aktiven Zentrum der VEGFR-2 Kinase Domäne

Abbildung 56 zeigt den Naturstoff **6** im aktiven Zentrum des ErbB-2 Modells. Auch hier finden sich die essentiellen Wasserstoffbrücken zur Hinge Region. Der L-Serin Rest imitiert auch hier die Wasserstoffbrücken der Ribose, allerdings ist aufgrund einer etwas anderen

Konformation des Nucleotide Binding Loop eine Wasserstoffbrücke zu Ser 720 günstiger als die bei VEGFR-2 und **98** gefundene Wechselwirkung mit Leu 840.

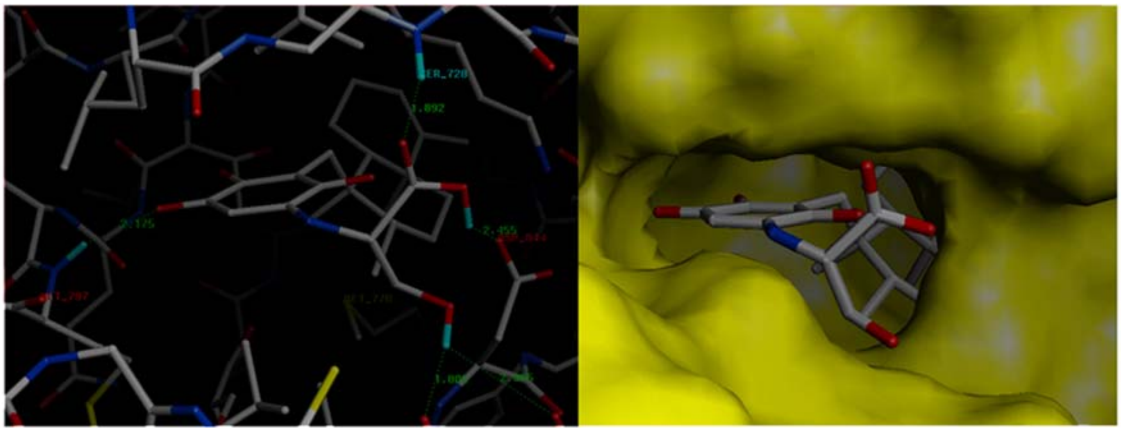


Abbildung 56: Nakijichinon C im aktiven Zentrum der ErbB-2 Kinase Domäne

Aus diesen Bindungsmodi ergibt sich eine schlüssige Erklärung für die beobachteten Selektivitäten. Überlagert man die Komplexe aus Kinase und Inhibitor am Computer, ist sofort zu erkennen, dass die bereits angesprochenen Substitution im Bereich der hydrophoben Tasche deren Form und Größe verändern. Versucht man Nakijichinon C in das aktive Zentrum der VEGFR-2 Kinase Domäne zu docken, führt dies zwangsläufig zu einer Überlappung der C-2 Methylgruppe mit der Seitenkette von Val 899. In ErbB-2 findet sich an dieser Position hier Serin 779, dessen sterischer Anspruch geringer ist. Vermutlich aus dem gleichen Grund zeigen zahlreiche Nakijichinonanaloga aus der Bibliothek mit identischer Konfiguration an C-2 ebenfalls keine Inhibition von VEGFR-2. Umgekehrt erfordert das Docking von **98** in das aktive Zentrum von ErbB-2 eine Drehung des Dekalinsystems im Vergleich zur Bindung an VEGFR-2 um einer Überlappung der C-5 Methylgruppe mit Met 770 (Leu 889 in VEGFR-2) auszuweichen. Diese Drehung bringt jedoch die C-2 Methylgruppen in direkten Kontakt mit Thr 834 und Leu 833 in ErbB-2. Das Cys 1045 bzw. Val 916 in VEGFR-2 verursachen hier keine sterische Abstoßung. Die Differenzen im hinteren Teil des hydrophoben Tasche verursachen also eine Verschiebung der beiden Inhibitoren. Überlagert man bei Komplexe aus Kinase und Inhibitor, so dass die *Hinge* Regionen sich exakt überdecken, liegt der Abstand zwischen korrespondierenden C-Atomen der Dekalinsysteme bei 2,6-2,8 Å. Diese Verschiebung wiederum bedingt einen sterischen Konflikt der C-2 Methylgruppen mit Resten im vorderen Teil der hydrophoben Tasche, nahe der Purin-Bindungsstelle. Dies erklärt die Umkehr der Selektivität. Aus diesen Bindungsmodi folgt auch, warum die strukturell ähnlichen Analoga aus der Bibliothek mit D-Aminosäuren als Substituenten keine Inhibition von ErbB-2 und VEGFR-2 bei den biologischen Tests zeigten. Eine sterische Abstoßung mit Val 848 und Leu 840 im *Nucleotide Binding Loop* wäre die Folge. Anzumerken ist hier, dass die Konstruktion zweier Homologiemodelle für VEGFR-2 sehr hilfreich war, da dadurch die Bewegung der C-Helix in Richtung des Inhibitors besser

zu verstehen war. In den Abbildungen ist ein Ausschnitt aus dem Modell A von VEGFR-2 gezeigt.

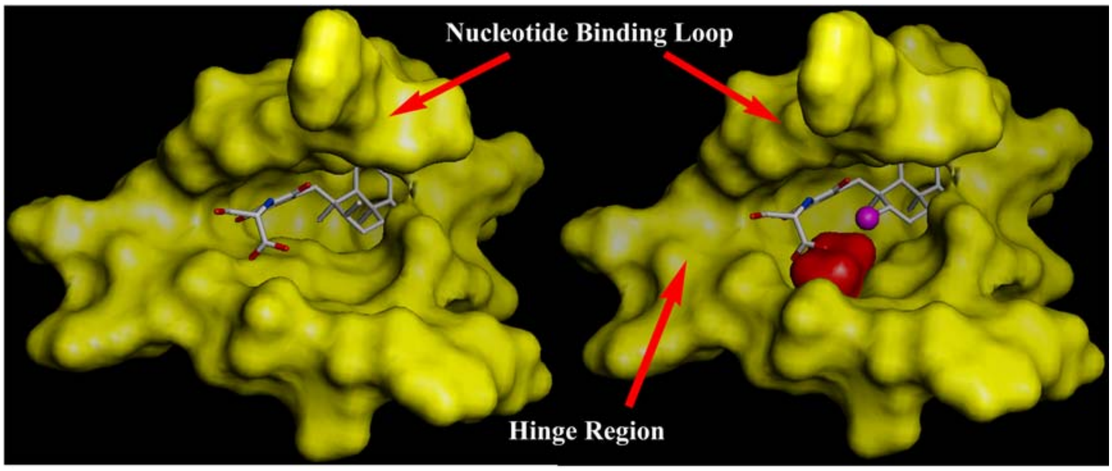


Abbildung 57: C-2 a) 98 im aktiven Zentrum von VEGFR-2, b) Nakijichinon verursacht eine repulsive Wechselwirkung mit Leu 1035(rot) in VEGFR-2, die C-2 Methylgruppe ist magenta gefärbt

4.2.5.1.1 Wechselwirkung von 6 und 98 mit Tie-2 und IGF1R

Eine weitere Bestätigung für die Richtigkeit des hier vorgeschlagenen Bindungsmodells für Nakijichinon C (**6**) und dessen C-2 Epimer (**98**) folgte aus der Übereinstimmung mit experimentellen Daten bezüglich einer Inhibition von Tie-2 oder IGF1R. Hierzu wurden die Strukturen der Kinasedomänen von ErbB-2, VEGFR-2, Tie-2 und IGF1R überlagert und die Inhibitoren in die jeweiligen aktiven Zentren gedockt. Auch die fehlende Inhibition von Tie-2 oder IGF1R durch Nakijichinon C bzw. das C-2 Epimer ist auf sterische Gründe zurückzuführen. Nakijichinon C kann aufgrund abstoßender Wechselwirkungen der C-2 Methylgruppe mit Met 1139 nicht an IGF1R binden. Die Inhibition von IGF1R durch **98** wird durch abstoßende Wechselwirkungen mit Met 1076 und Met 1051 verhindert. Störende Wechselwirkungen sowohl von Nakijichinon C als auch dem C-2 Epimer insbesondere durch die C-4a Methylgruppe am Dekalingerüst mit Ile 886 und Ile 902 von Tie-2, welche die hydrophobe Tasche im Vergleich zu VEGFR-2 verkleinern und deren Form ändern, sind die Gründe für die fehlende Inhibition von Tie-2 durch diese Substanzen.

4.2.5.2 Bindung von 101 and Tie-2 und IGF1R

Analog zu den bisher analysierten Inhibitoren, bindet auch 101 über Wasserstoffbrücken an die Hinge Region der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Neben der Wechselwirkung mit Glu 903 und Ala 905[****], wird eine Wasserstoffbrücke zu Asn 909 gebildet. Das Dekalingerüst findet in der hydrophoben Tasche Platz. Verbindung 101 inhibiert Tie-2 im niedrigen micromolaren Bereich, zeigt aber zugleich keine inhibierende Wirkung auf VEGFR-2, VEGFR-3, oder ErbB-2.

[****] Die Numerierung bezieht sich auf Tie-2. Glu 903 entspricht Glu 917 in VEGFR-2. Die Substitution von Cys 919 (VEGFR-2) für Ala 905 findet sich in Zeile 8 (Tabelle 5)

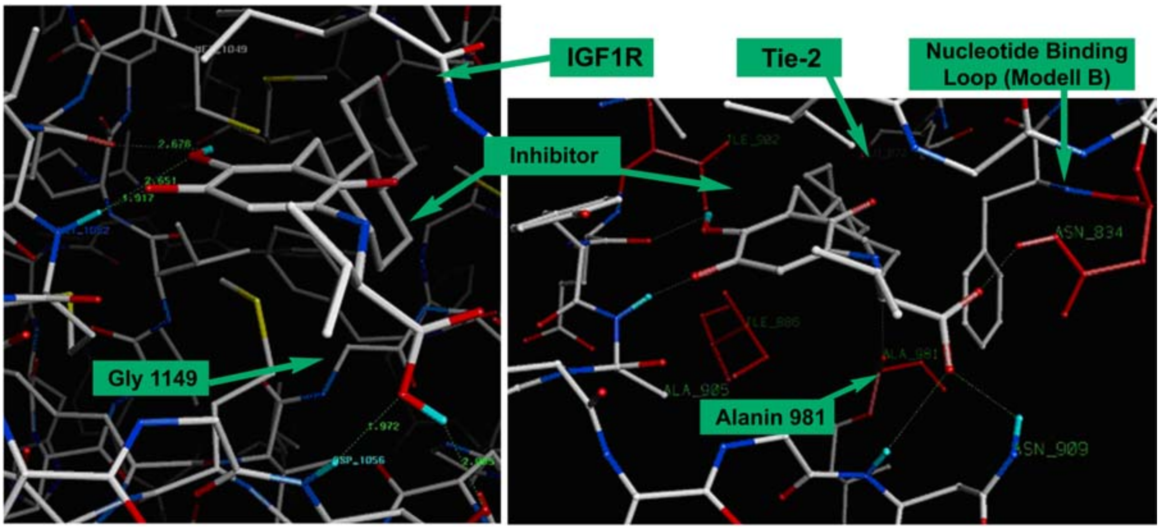


Abbildung 58: Bindung von 101 an IGF1R (links) und Tie-2 (rechts)

Grund für die beobachtete Selektivität dürften ungünstige Wechselwirkungen des Dekalingerüsts mit Cys 1045 in VEGFR-2 bzw. Cys 993 in in VEGFR-3 bzw. Thr 843 in ErbB-2 sein. Ala 981 in Tie-2 stört hier nicht (siehe Zeile 10 in Tabelle 5). Zu den sterischen Gründen kommt bei der Bindung an Tie-2 die Möglichkeit zur Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der Carboxylatgruppe von 101 und Asn 834 von Tie-2 (*Nucleotide Binding Loop*). An dieser Stelle findet man in VEGFR-2 und VEGFR-3 ein Alanin, so dass die zusätzliche Bindungsenergie nicht zu Verfügung steht. Verbindung 101 und der hier vorgeschlagene Bindungsmodus bestätigen auch die Hypothese, dass die Struktur der Kinase auch von Art und Größe des Inhibitors abhängt. In diesem Fall war das Modell A von Tie-2 nicht geeignet, die Selektivität vollständig zu erklären. Das manuelle Docking in das aktive Zentrum von Modell B führte jedoch zu schlüssigen Erklärungen. Die gute Affinität zu Tie-2 wird demnach nicht alleine durch den zusätzlichen Beitrag einer weiteren Wasserstoffbrücke bedingt. Die hydrophoben Wechselwirkungen des Dekalingerüstes mit Ile 902 und Ile 866 in der hydrophoben Tasche werden ergänzt durch die Interaktion mit Phe 835. In Modell A ist dieser Rest zu weit vom Inhibitor entfernt. Aufgrund der zusätzlichen Wasserstoffbrücke zu Asn 834 und der Wechselwirkung mit Phe 835 dürfte **101** den *Nucleotide Binding Loop* von Tie-2 in einer Konformation stabilisieren, wie sie in Abbildung 58 gezeigt ist.[††††] Diese zusätzliche Bindungsenergie erklärt auch, warum hier das Analogon mit L-Valin nicht aktiv ist. Bei der für die Bildung der Wasserstoffbrücke erforderlichen Drehung des Valin-Restes käme es zu einer sterischen Abstoßung mit dem *Nucleotide Binding Loop.*

Die gleichen Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen, wie sie im Komplex von Tie-2 und **101** auftreten, finden sich auch im Komplex von IGF1R und **101**. Wie aus Tabelle 5 (Zeile 10) ersichtlich, entspricht Ala 981 aus Tie-2 das Gly 1149 in IGF1R. Eine

[††††] Die unterschiedlichen Konformationen der Nucleotide Binding Loops der Tie-2 Modelle A und B sind auch aus den Abbildungen in Anhang IV ersichtlich.

sterische Abstoßung wie bei VEGFR-2 wird daher auch nicht beobachtet. Analog zu Tie-2 findet durch die Wasserstoffbrücke zu Ser 1006 im *Nucleotide Binding Loop* von IGF1R eine Verstärkung der hydrophoben Wechselwirkung des Dekalins mit Phe 1007 statt. Die 18-fach stärkere Inhibition von IGFR1R durch **101**, verglichen mit Tie-2 könnte auf stärkere Wechselwirkungen mit den Aminosäuren in der hydrophoben Tasche zurückzuführen sein (siehe hierzu Abschnitt 4.2.6.2). Aus den gezeigten Bindungsmodus ergibt sich auch, warum das Analogon zu **101** mit L-Valin IGF1R nicht inhibiert. Zur Bindung an IGF1R wäre ein Rotation um die Bindung zwischen Chinon und Stickstoff erforderlich, was jedoch den Verlust der Wasserstoffbrücke zu Asp 1083 in IGF1R verursachen würde. Dies spricht für die Bedeutung, die Substitutenten haben, welche die Wechselwirkungen der ATP Ribose mit der Kinase imitierren.

4.2.5.3 Bindung von 99 an Tie-2

Ein weiteres interessantes Mitglied der Nakijichinonbibliothek ist Verbindung **99**. Das generelle Muster der Inhibitoren findet sich hier nur unvollständig wieder. Ein hydrophober Teil wird zwar ergänzt durch eine polare Einheit mit 3 Wasserstoffbrückenakzeptoren. Das Donor-Akzeptor-Motif, charakteristisch für viele Kinaseinhibitoren fehlt jedoch. Auffallend ist weiterhin, dass **99** keinen Aminosäuresubstituenten hat, der die Wechselwirkungen zwischen Kinase und Ribose imitiert. **99** passt sehr gut in die hydrophobe Tasche von Tie-2, wobei auch hier das Modell B bessere Resultate ergab. Bei einer CHARMM-Minimierung des Komplexes wurde in der Tat ein hydrophober Kollaps beobachtet, wie in A. Bridges für viele Kinaseinhibitoren postulierte.[19] Dies bestätigt erneut den Ansatz, der Flexibilität der Kinasen durch die Konstruktion verschiedener Homologiemodelle Rechnung zu tragen. **99** kann auch in die hydrophobe Tasche von KDR einpasst werden. Dafür ist allerdings eine leichte Verschiebung in Relation zur Position in Tie-2 erforderlich, die jedoch das Ausbilden von Wasserstoffbrücken zur Hinge Region verhindert. Für diese Verschiebung ist die Substitution von Ala 981 in Tie-2 zu Cys 1045 in VEGFR-2 verantwortlich. Cys 993 (VEGFR-3) und Thr 843 (ErbB-2) wären demnach für den gleichen Effekt bei den anderen Kinasen verantwortlich. Die könnte die Ursache für die Selektivität sein. Im Bezug auf die fehlende Wirkung gegen IGF1R käme die Substitution von Ile 902 in Tie-2 durch Met 1076 in Betracht. Dies erscheint allerdings nicht zwingend, da **99** aufgrund des geringen sterischen Anspruches auch anders an IGF1R binden könnte. Die Selektivität von **99** ist im Bezug auf IGF1R durch rein sterische Argumente nicht so eindeutig zu erklären, wie dies für die vorangegangenen Inhibitoren der Fall war.

4.2.5.4 Bindung von 100 an IGF1R, VEGFR-3 und Tie-2

Während viele der Verbindungen aus der Nakijichinon C-Bibliothek aufgrund ihres Aufbaus (Dekalin-Chinon-Aminosäure) in vergleichbaren Bindungsmodi mit den Kinasen wechselwirken, passt Verbindung **100** nicht in dieses Bild. Anstelle eines hydrophoben Teils

findet sich eine zweite Aminosäure, die kaum geeignet erscheint in der hydrophoben Tasche zu binden. Das Muster von Wasserstoffbrückenakzeptoren und -donoren ermöglich aber einen komplett anderen Bindungsmodus, bei dem die Verbindung die Triphosphat- Bindungstasche belegt und dadurch ebenfalls zu ATP-kompetitiv wirken kann. Die kinetische Untersuchungen von Herrn Dr. R. Mazitschek an der Universität Karlsruhe bestätigen eine ATP kompetitive Inhibition durch **100**. Die Triphosphatbindungstasche zählt zu den hochkonservierten Bereichen der Kinasedomänen und **100** zeigt daher erwartungsgemäß auch eine reduzierte Selektivität. Sowohl IGF1R als auch VEGFR-3 und Tie-2 werden im einstelligen Mikromolaren Bereich inhibiert. Der ermittelte Bindungsmodus ist in Abbildung 59 gezeigt.

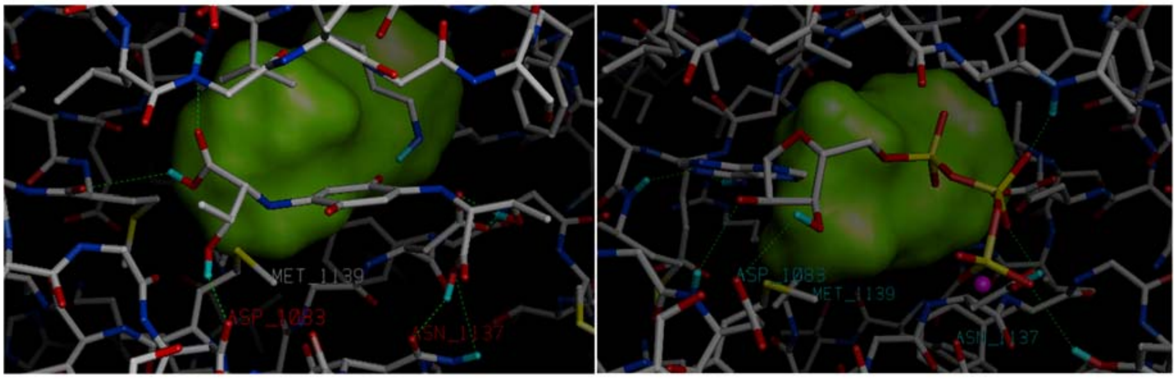


Abbildung 59: a) Vorgeschlagene Bindungsmodus von 100 (hier an IGF1R). Die leere hydrophobe Tasche ist grün dargestellt (AAV-MM13) b) Bindung von ATP an IGF1R zum Vergleich[‡‡‡‡]

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Selektivität zwischen VEGFR-2 und VEGFR-3. Innerhalb der Kinasedomäne sind beide Rezeptoren zu 78,4% identisch,[82] so dass die beobachtete Selektivität zunächst überraschen mag. Am Ende des *Activation Loops*, in einem Bereich dessen Konformation bei allen betrachteten Rezeptoren sehr ähnlich ist, findet sich jedoch der entscheidende Unterschied.[§§§§] **100** bindet in dem Bereich, in dem das γ-Phosphat von ATP auf das Substratpeptid übertragen wird. VEGFR-3 hat an der relevanten Stelle einen Serinrest, in VEGFR-2 findet sich hier jedoch eine Asparaginsäure. Unter physiologischen Bedingungen dürfte dies eine elektrostatische Abstoßung zwischen dem Carboxylat von **100** und dem Carboxylat der Seitenkette von Asp 1064 in VEGFR-2 verursachen, die destabilisierend auf die Bindung von **100** an VEGFR-2 wirkt. Verbindung **100** könnte daher aufgrund dieses Bindungsmodus als Leitstruktur für eine neue Klasse von Kinaseinhibitoren dienen, die nicht notwendigerweise Wasserstoffbrücken zur *Hinge Region* bilden, sondern Wechselwirkungen in der Triphosphatbindungstasche für die Affinität nutzen. Allerdings sollte durch Anfügen hydrophober Gruppen und Belegung der hydrophoben Taschen die Selektivität zugunsten bestimmter Kinasen verbessert werden (siehe Kapitel 4.2.7). Als

‡‡‡‡ Für eine bessere Übersicht wurde die Kinase im rechten Bild um 20 ° nach links gedreht.

§§§§ Die hierfür relevanten Aminosäuren sind in Tabelle 5 grün markiert.

Hinweis für die Richtigkeit und Plausibilität diese Bindungsmodus kann die Bindung von Geldanamycin an das ATP-bindende Hitzeschock Protein HSP-90 betrachtet werden.[126] Auch hier wird die Triphosphatbindungsstelle blockiert und die Wirkung des Proteins beeinträchtigt. Geldanamycin war ursprünglich als EGFR Inhibitor propagiert worden. Mittlerweile ist bekannt, dass die Wirkung auf eine Inhibition der ATPase Aktivität von HSP-90 zurückzuführen ist. Dies verhindert die Lokalisierung von EGFR an der Plasmamembran, so dass der Rezeptor in die Lysosomen transportiert wird.[127]

4.2.6 Quantitative Analyse der Bindungsmodi

Neben der vorstehend beschriebenen qualitativen Analyse der Bindungsmodi wurden in der Folge Anstrengungen unternommen, diese durch quantitative Bewertungen zu stützen. Während die Charakterisierung und Bewertung einzelner Wasserstoffbrücken, wie hier durchgeführt, auch manuell möglich ist, bleibt die Summierung aller Wechselwirkungen, die mit dem Begriff „hydrophober Bindungsbeitrag“ in der Literatur aufsummiert werden, computergestützten Verfahren (Scoring Function) vorbehalten. Um auch hydrophobe Wechselwirkungen bewerten zu können wurde eine neues Verfahren entwickelt.

4.2.6.1 Beitrag der Wasserstoffbrücken

Die zahlreichen Wasserstoffbrücken, die bei der Beschreibung der Bindungsmodi erwähnt wurden, unterscheiden sich im Bezug auf Länge und Geometrie. Als Maß für die Güte der vorgeschlagenen Bindungsmodi wurden daher die Wasserstoffbrücken hinsichtlich Länge und Geometrie charakterisiert. Dieser Ansatz wurde von G. Böhm und G. Klebe im Programm LUDI verwirklicht. Die dort integrierte Scoring Funktion eignet sich allerdings nicht für eine isolierte Bewertung von Wasserstoffbrücken. Der Vergleich mit den in der Literatur als optimal akzeptierten Werten ergab Hinweise auf die Stärke der Wechselwirkung. Diese diente in einem iterativen Prozess zur Überprüfung und Verbesserung der vorgeschlagenen Bindungsmodi. Die gemäß AAV-MM13 bestimmten Werte sind in Anhang III aufgelistet.

4.2.6.2 Beitrag von hydrophoben Wechselwirkungen

Anstelle einer Scoring Funktion, die nach Berechnung und Addition der van-der-Waals-Wechselwirkungen für jedes Atom diese in Relation zu anderen Wechselwirkungen setzt, wurde für die vorliegende Arbeit eine einfach durchzuführende und schnelle Alternative entwickelt. Wie in Kapitel 2.3.3.3.3 beschrieben, beruht der hydrophobe Effekt (zumindest teilweise) auf der Verdrängung von Wassermolekülen aus einer hydrophoben Tasche und der liphophilen Interaktion des Inhibitors mit dem Rezeptor in dieser Tasche. Je besser der Inhibitor diese Tasche ausfüllt, desto stärker ist die Wechselwirkung. Auf diesem Ansatz aufbauend, wurden die Volumina der hydrophoben Taschen der hier betrachteten Kinasen

berechnet und mit den van der Waals Volumina der Dekalinsysteme in Relation gesetzt. Die in AAV-MM16 zusammengefassten Programmanweisungen erlauben eine fast vollständig automatisierte Berechnung des Ausmaßes, in dem ein Inhibitor die hydrophobe Tasche einer Kinase belegt. Die Berechnung der Volumina der hydrophoben Taschen wurde folgendermaßen durchgeführt: Mittels des im Programm PASS implementierten Algorithmus (siehe Kapitel 2.3.3.3.4), wurde das Volumen der hydrophoben Tasche mit sphärischen Solvensmolekülen von 1,4 Å Durchmesser gefüllt. Dies entspricht dem Volumen, das theoretisch von in dieser Tasche befindlichen Wassermolekülen ausgefüllt würde.

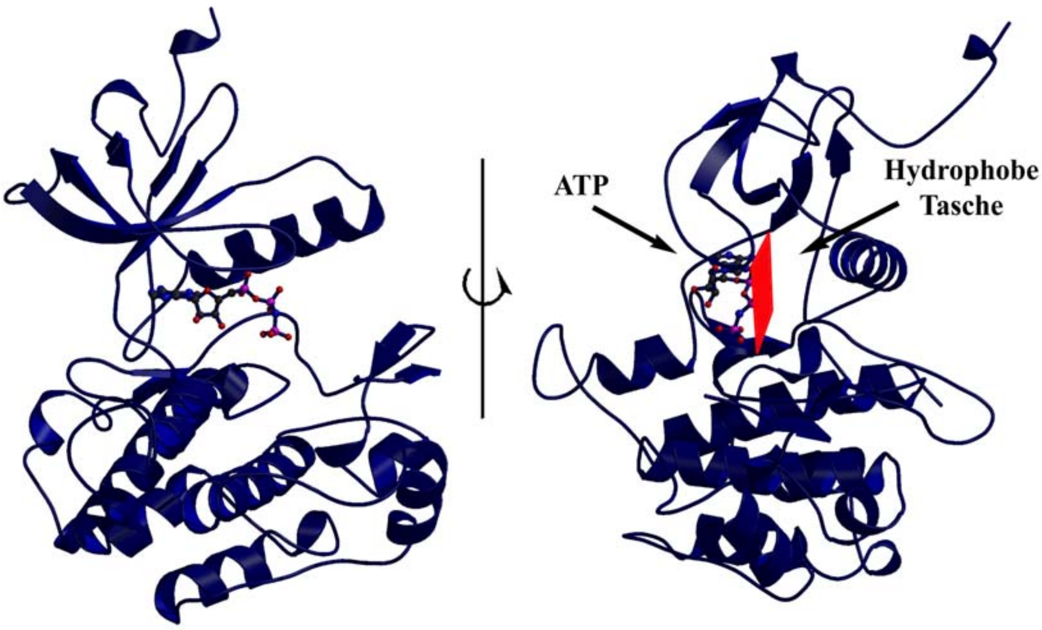


Abbildung 60: Kristallstruktur des IGF1R Rezeptors: a) Frontalansicht (entspricht den anderen Abbildungen) b) Drehung nach links um 90°. Für die Abgrenzung der hydrophoben Tasche wurde die im Text beschriebene Ebene (hier rot eingezeichnet) verwendet.

Zur Abgrenzung der hydrophoben Tasche von der Purin-Bindungstasche wurde eine Ebene als Schnittstelle definiert. Die Atome Phe 1007 Cα und C sowie Val 1075 Cα sowie C definierte Ebene ist in Abbildung 60 rot dargestellt. Alle Solvensmoleküle, die sich in Abbildung 60 rechts der Ebene befanden, wurden zur hydrophoben Tasche gerechnet. Die links der Ebene liegenden Solvensmoleküle belegen die Purin-Bindungsstelle. Gemäß AAV-MM11 wurde nun das Volumen der hydrophoben Taschen des IGF1 Rezeptors berechnet. Die Werte für die anderen Kinasen wurden auf die gleiche Weise berechnet, in dem die jeweils korrespondierenden Aminosäuren zu Definition der begrenzenden Ebene herangezogen wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Kinase	Tie-2	IGF1R	VEGFR-2	VEGFR-3	ErbB-2
Volumen	273,48	121,55	272,32	273,51	253,95

Tabelle 6: Größe der hydrophoben Taschen der verschiedenen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (in $Å^3$)

Zur Veranschaulichung wurden die SA-Oberflächen dieser Taschen (AAV-MM21) berechnet. Sie sind in Abbildung 61 gezeigt. Gut zu erkennen sind die Unterschiede im Bezug auf Form und Größe. Diese spiegeln sich in gleicher Weise in den Dekalinsystemen wieder.

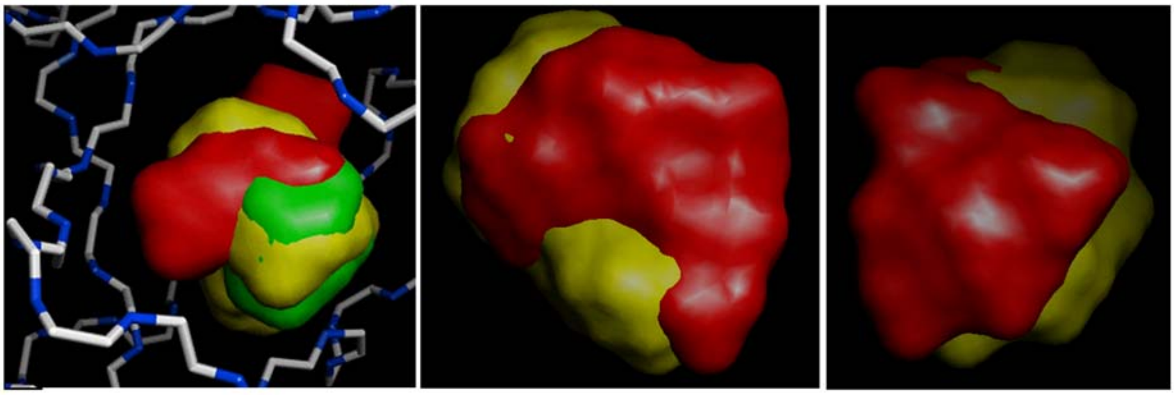


Abbildung 61: a) Die SA-Oberflächen der hydrophoben Taschen von IGF1R (grün), VEGFR-2 (gelb) und Tie-2 (rot), b) Vergleich der hydrophoben Taschen von ErbB-2 (rot) und VEGFR-2 (gelb), c) wie b, Ansicht um 90 ° gedreht.

Mit den auf diese Weise definierten Taschen konnte das Ausmaß quantifiziert werden, in dem die Dekalinsysteme der Inhibitoren die jeweiligen Tasche ausfüllen. Das vom Inhibitor belegte Volumen innerhalb der hydrophoben Tasche ergibt sich aus:

$$\text{Überlappungsvolumen } (V_{gemein}) = \text{Volumen}_{Inhibitor} + \text{Volumen}_{Tasche} - \text{Volumen}_{(Inhibitor+Tasche)}$$

Dividiert man das Resultat durch das zuvor berechnete van der Waals-Volumen der hydrophoben Tasche, erhält man den angegebenen Prozentwert. Dieser zeigt an, in welchem Ausmaß die hydrophoben Tasche durch den Inhibitor ausgefüllt wird ist. So füllt das Dekalinsystem von Nakijichinon C **6** die hydrophobe Tasche von ErbB-2 zu 95,7 % aus, während das Dekalinsystem von **98** die entsprechende Tasche von VEGFR-2 zu 92 % ausfüllt. Diese steht im Einklang mit den sehr ähnlichen IC_{50} Werten und den vergleichbar starken Wasserstoffbrücken. Erfreulicherweise gelang es auf diese Weise eine Erklärung für die gemessenen IC_{50} Werte für Verbindung **101** zu finden. Die bereits erwähnte 18-fach stärkere Affinität zu IGF1R dürfte demnach auf stärkere Wechselwirkungen in der hydrophoben Tasche zurückzuführen sein, wie sie durch den höheren Belegungsgrad (siehe Tabelle 7) bestätigt wird.

Kinase	IC_{50} von **101**	% der hydrophoben Tasche belegt
IGF1R	0,5 µM	84 %
Tie-2	9 µM	63 %
VEGFR-2	> 50 µM	46 %[*****]

Tabelle 7: Ausmaß der Belegung der hydrophoben Taschen von IGF1R, Tie-2 und VEGFR-2 durch 101

4.2.7 Vorschläge zur Optimierung

Die Zahl und Ähnlichkeit der in einer Zelle exprimierten Kinasen sowie die Selektivitätsprofile der bislang bekannten Inhibitoren machen es schwer, die Folgen der Inhibition einer einzelnen Kinase exakt zu bestimmen. Insofern stellen die Nakijichinon Analoga und die durch Aufklärung der Bindungsmodi gewonnenen Erkenntnisse eine interessante Möglichkeit dar, nach Optimierung der Inhibitoren mittels sehr selektiver molekularer Werkzeuge, verschiedene zelluläre Signalkaskaden getrennt zu untersuchen. Ziel einer weiteren Optimierung sollte die Verbesserung von Affinität und Selektivität bei gleichzeitiger Reduktion der Strukturen auf essentielle Merkmale sein. Daneben ist bei einer weiteren Entwicklung auch die Kompatibilität der Strukturen mit zellulären Systemen zu beachten. Strukturmerkmale, welche die Bindung an und Inhibition von Kinasen positiv beeinflussen sind einerseits eine hydrophile Gruppe, die orientierende Wasserstoffbrücken zur *Hinge Region* beiträgt, und andererseits ein hydrophober Teil, der nicht nur einen Großteil der Affinität bedingt, sondern auch für die Selektivität hauptverantwortlich scheint. Ein Molekülteil, welches als „Ribose Mimic“ weitere Wechselwirkungen mit der Kinasedomäne beträgt scheint ebenfalls von Vorteil zu sein.

Ein Vorteil einer Nakijichinon-verwandten Bibliothek wäre die Möglichkeit, das Substitutionsmuster des Dekalinsystems einerseits aufgrund der Molecular Modelling Ergebnisse zu verändern und andererseits verschiedene Verfahren zum Aufbau von Dekalinsystemen in kombinatorischen Synthesen zu verwenden. Damit wäre immer noch die strukturelle Nähe zum bereits biologisch validierten Startpunkt Nakijichinon C gegeben. Im Hinblick auf die angesprochene Kompatibilität zu zellulären Systemen ist das Chinongerüst als eher bedenklich einzustufen. In einem in vitro Test, wie er hier vorgenommen wurde, ist diese Struktur weniger störend. In einer Zelle können Chinone jedoch toxisch wirken, was die Interpretation nicht nur erschwert, sondern die Verbindung auch von einer weitergehenden Entwicklung, d. h. klinischen Evaluierung, ausschließt. Zu den mit Chinonen in Verbindung gebrachten in vivo Effekten gehören Zytotoxizität, Immunotoxizität und Krebsentstehung. Die Ursachen sind sehr komplex. Chinone können als Michael-Akzeptoren wichtige Proteine oder die DNA alkylieren oder durch Redox-Prozesse zur Bildung von Superoxid- und Peroxidradikalen führen. Zu den Resultaten dieses oxidativen Stresses gehören unter

[*****] Die reduzierte Aktivität ist auch auf sterische Gründe zurückzuführen.

Anderem die Aktivierung der PKC und Ras sowie DNA-Modifikationen (Bildung von 8-Oxodesoxyguanosin) und damit verbundenen Alterungsprozessen oder Transformationen.[146] Die Suche nach Strukturen, welche die Hydroxychinon-Einheit bioisoster ersetzen können führte zur Substitution des Chinons durch ein γ-Pyron (siehe Abbildung 62), das generell weniger toxisch ist und dennoch ähnliche Subsitutionsmuster erlaubt, wodurch die Erkenntnisse über die Beeinflussung der Selektivität durch die Substituenten direkt weiter verwendet werden könnten. Pyrone sind als Bestandteile oral verfügbarer Wirkstoffe bekannt.[147,148]

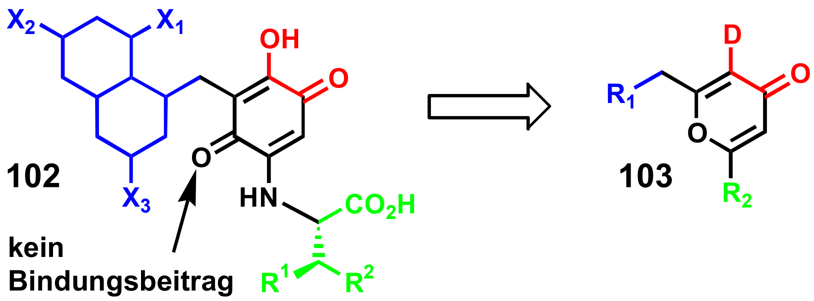


Abbildung 62: Modifikation des Nakijichinon Gerüstes. Über die Substitution im (blau gekennzeichneten) hydrophoben Teil, könnte die Selektivität gesteuert werden: IGF-1R selektiv: X_1 = H, X_2 = CH_3 (oder CH_2CH_3), X_3 = H und Tie-2 selektiv: X_1 = CH_3, X_2= H, X_3 = CH_3 (oder $CH(CH_3)_2$) D = Wasserstoff-brückendonor.

Über die in Abbildung 62 markierten Positionen „X_1“, „X_2“ und „X_3“ sollte sich die Selektivität der Inhibitoren zugunsten von Tie-2 oder IGF1R einstellen lassen. Keines der hier untersuchten Nakijichinon Analoga, wies ein Heteroatom im hydrophoben Dekalinsystem auf. Die unmittelbare Nachbarschaft der in Abbildung 62 durch „X_2“ gekennzeichneten Position zu den für die Katalyse essentiellen und daher konservierten Aminosäuren Lys 855 und Glu 872[†††††] eröffnet die Möglichkeit, beispielsweise durch Einbau eines Stickstoffatoms in den Ring (anstelle eines Substitutenten „X_2“, siehe Abbildung 62), über eine Wechselwirkung mit Glu 872 die gesamte Kinasedomäne in einer geschlossenen Konformation über diese Wechselwirkung mit der C-Helix zu stabilisieren. Die Position von Ser 779 und Thr 843 in ErbB-2 (Zeile 3 und Zeile 10 in Tabelle 5) bieten die Möglichkeit selektive und verbesserte Inhibitoren für ErbB-2 durch Inkorporation geeigneter H-Brücken Akzeptoren zu synthetisieren. Dieser Wasserstoffbrückenakzeptoren wäre hierfür in den mit „X_1“ und in „X_3“ in Abbildung 62 markierten Positionen zu platzieren.

Neben der Variation des Nakijichinon Gerüstes, wäre es auch denkbar, die hier gewonnenen Erkenntnisse auf andere Strukturen zu übertragen. Lactame, wie in Abbildung 63 gezeigt, könnten die erforderlichen Wasserstoffbrücken beisteuern. Eine ebenfalls interessante Variante wäre ein Rückgriff auf die Struktur von Thalidomid (Contergan).[149] Hier wäre die Addition eines „Ribose-Mimics“ ebenso sinnvoll, wie die Eliminierung einer der beiden Carbonylgruppen.

[†††††] Die Nummerierung bezieht sich auf Tie-2.

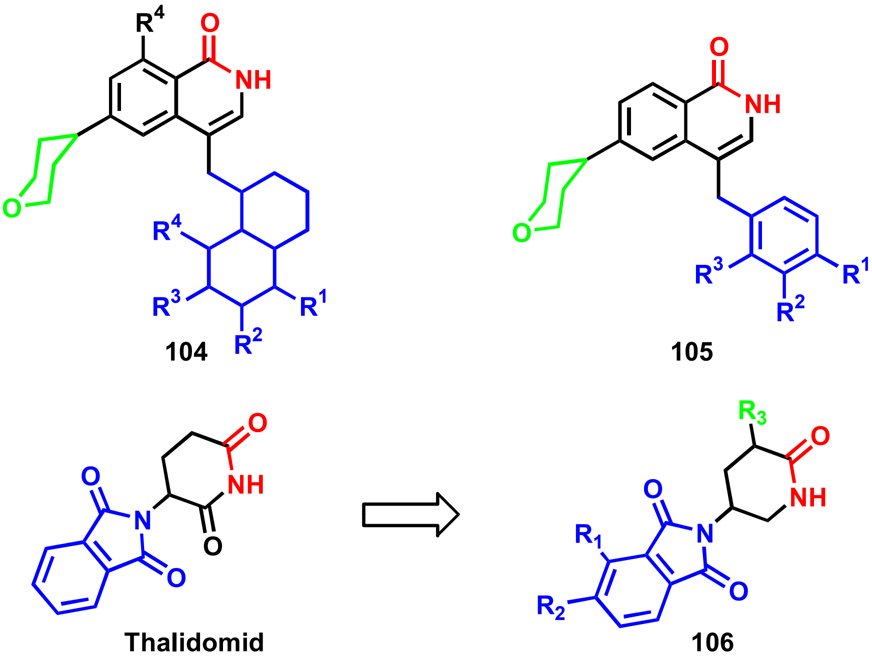


Abbildung 63: Vorschläge für Strukturen optimierter Kinaseinhibitoren.

Verbindung **104** könnte, wie in Abbildung 64 dargestellt, an Tie-2 oder VEGFR-2, in Abhängigkeit von den Resten R_1 bis R_4 binden. Aufgrund ihrer modularen Struktur eignet sich die vorgeschlagene Struktur ideal zur weiteren Optimierung mittels der Synthese eine fokussierten kombinatorischen Bibliothek.

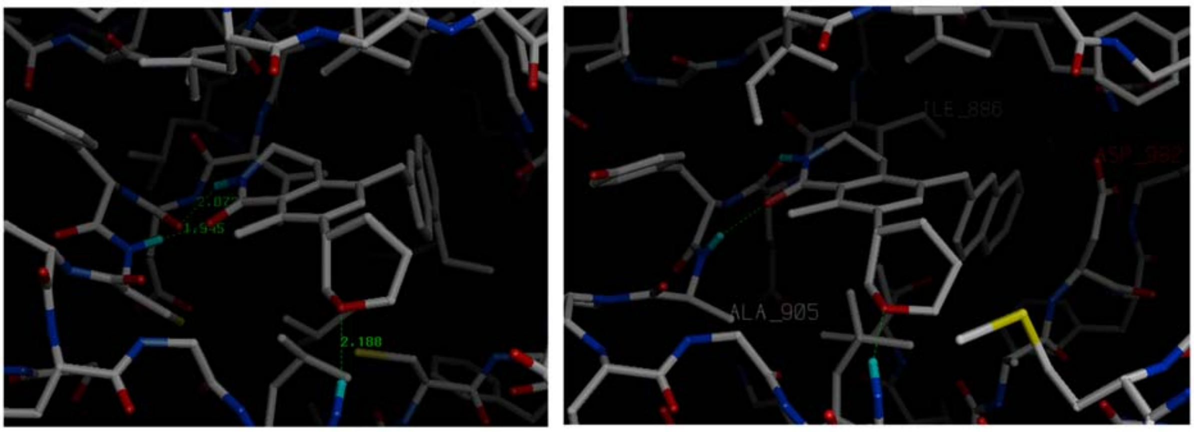


Abbildung 64: 104a (links) im aktiven Zentrum von VEGFR-2 und 104b (rechts) im aktiven Zentrum von Tie-2

Für die hier gezeigten Verbindungen wurde gemäß dem in Abschnitt 4.2.6.2 erläuterten Verfahren das Ausmaß bestimmt, in dem die hydrophoben Taschen ausgefüllt werden. Verbindung **104a** füllt die Tasche demnach zu 70 % aus, während **104b** die Tasche zu 55 % ausfüllt. Das Hinzufügen weiterer Substituenten am Naphthalingerüst wäre daher denkbar.

Ergänzt wird dieses Bild der Bindungsmodi von Nakijchinon-Analoga durch den andersartigen Bindungsmodus von **100**. Neben der in Abbildung 65 gezeigten Möglichkeit der Einführung eines selektivitäts-verbessernden hydrophoben Substituenten „R^1“ (**107**)

könnte diese auch über Veresterung einer der beiden Carboxylatfunktionen eingeführt werden (**108**). Auch hier wäre eine Abkehr vom der chinoiden Struktur sinnvoll.

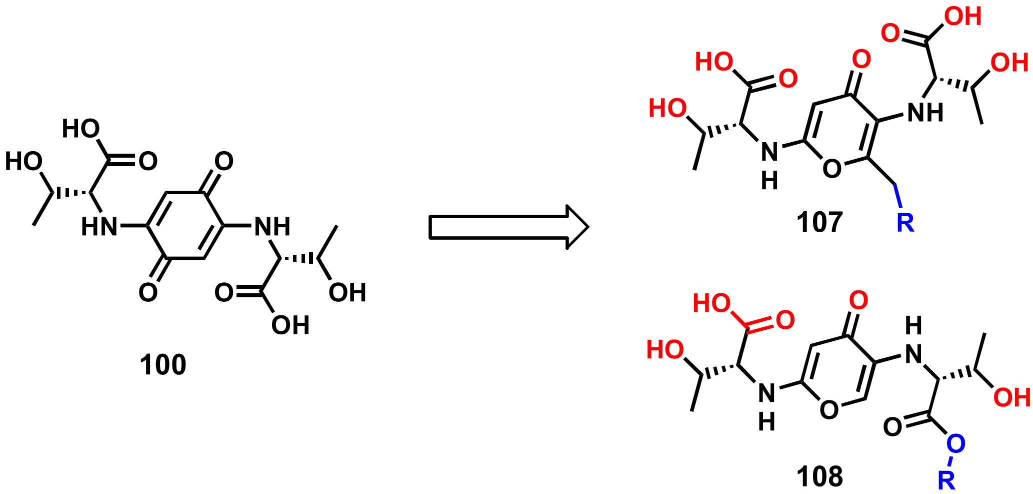


Abbildung 65: Modifikation von 101 als neue Leitstruktur. Die Selektivität könnte durch Einfügen eines hydrophoben Restes (blau) gesteigert werden. Die rot markierten Sauerstoffatome binden in der Triphosphatbindungsregion.

4.3 Untersuchung einer Bibliothek von Pepticinnamin E Analoga

Efficient library design is best achieved through dialogue between a combinatorial chemist and a computational chemist. S.Rose[150]

4.3.1 Vorüberlegungen

Um die Wirkungsweise von Inhibitoren der PFT aufzuklären, ist zunächst eine Analyse der Bindung der natürlichen Substrate bzw. des Katalysemechanismus erforderlich. Die PFT wurde mehrfach kristallisiert, mit und ohne Substrate bzw. Liganden.[151-153] Die Erkennung des Farnesylpyrophosphats durch das Enzym erfolgt über die lange lipophile Farnesylkette (blau gefärbt in Abbildung 66b), die in einer hydrophoben Tasche der PFT gebunden wird, während über die Wechselwirkung mit einem hydrophilen Bereich die Pyrophosphat-Gruppe (im Vordergrund, rot gefärbt) fixiert und in unmittelbare Nähe zu einem Zn^{2+} (violett) im aktiven Zentrum der PFT gebracht wird

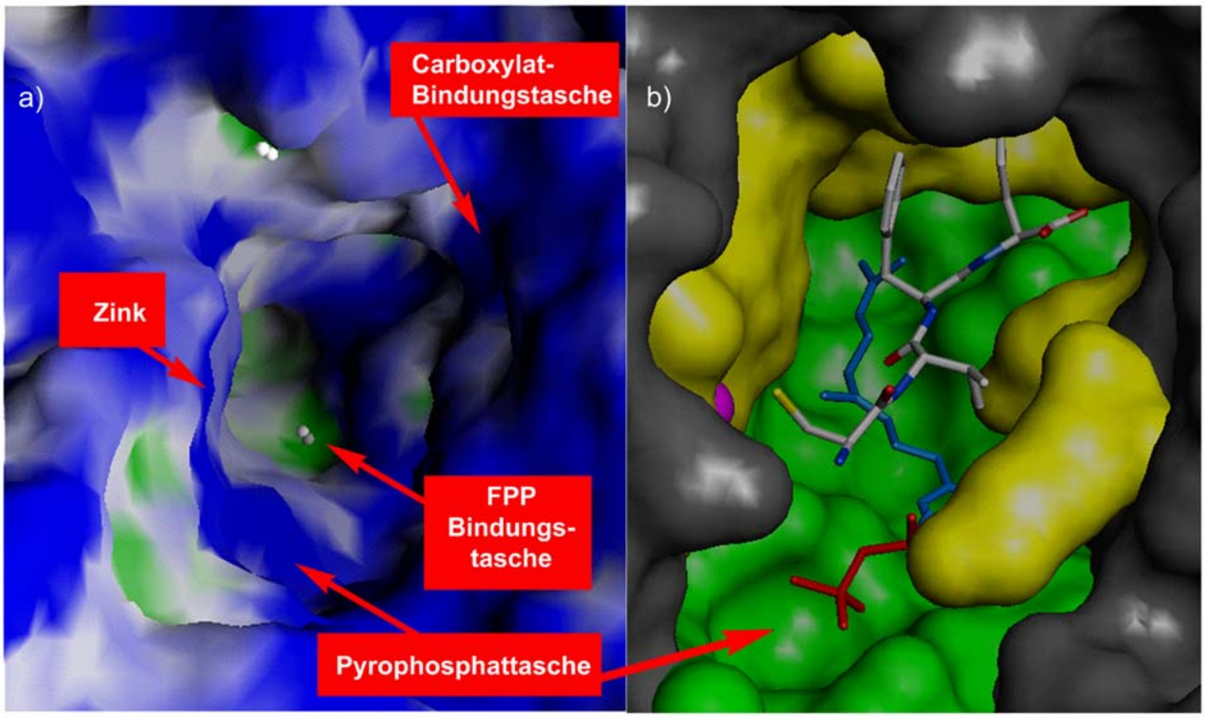


Abbildung 66: a) Hydrophobizitätskarte der PFT, b) Farnesylpyrophosphat und CVFM Peptid im aktiven Zentrum der PFT

An dieses Metallion bindet das Cystein der CAAX-Box des Proteins. Eine wichtige Rolle spielt weiterhin die Seitenkette der aliphatischen Aminosäure A_2, die in eine hydrophobe, mit aromatischen Resten ausgekleidete Tasche bindet (linkere obere Hälfte) und die Aminosäure X (hier ein Methionin, oben rechts), welche über die Carboxyl-Funktion mit basischen Aminosäuren des Enzyms wechselwirkt und über den Charakter seine Seitenfunktionalität die Selektivität gegenüber verschieden Prenyltransferasen determiniert. In dem in Abbildung 66b gezeigten Ausschnitt aus der Kristallstruktur der Rattenfarnesyltransferase ist die Peptidbindungsstelle gelb eingefärbt, die FPP-Bindungstasche dagegen grün. Daneben ist die Hydrophobizitätskarte des aktiven Zentrums gezeigt (Abbildung 66a, siehe auch

Experimenteller Teil). Neben einer hydrophoben (grün-grau) Farnesyl-Bindungstasche sind die sehr hydrophilen (blau) Bindungsstellen für das Pyrophosphat und das *C*-terminale Carboxylat gezeigt. Für die hier gezeigten Arbeiten wurde die Kristallstruktur der Ratten-PFT verwendet, da diese auch in den biologischen Assays eingesetzt wurde.[154] Innerhalb des aktiven Zentrums gibt es keinen Unterschied zur menschlichen PFT.

4.3.1.1 Wechselwirkungen zwischen Zink-haltigen Proteinen und den Inhibitoren

Zusätzlich zu Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen spielt bei der Farnesyltransferase die Wechselwirkung zwischen Ligand und Zink-Ion eine zentrale Rolle.
Das Zn^{2+} Kation zeigt eine gewisse Flexibilität hinsichtlich der bevorzugten Koordinationsgeometrie. Während in wässriger Lösung ein hexakoordiniertes Ion vorliegt, ist Zink in Proteinen meist tetraedrisch koordiniert.[155] Einige der ersten Versuche die bevorzugte Geometrie zu berechnen können nicht direkt auf Proteinstrukturen übertragen werden, da sich die Kalkulationen auf die Gasphase beziehen. Dudev et al. unternahmen umfangreiche DFT Rechnungen und konnten die Komplexe in einer Hydrathülle simulieren.[156] Demzufolge ist die tetraedrische Geometrie deutlich bevorzugt. Der optimale Bindungsabstand zu einem H_2O Sauerstoff beträgt demnach 1,97 Å während der Stickstoff des Histidins idealerweise etwa 2,01 Å vom Zink Ion entfernt ist. Die Bindung eines Imidazol-Liganden ist nach diesen Berechnungen günstiger als die eines Wassermoleküls, da hierdurch die postive Ladung am Zink offenbar stärker vermindert wird. Diese Wechselwirkung wird durch die N-Methylierung des Imidazols noch verstärkt. Dies dürfte nebst positiver pharmakodynamischer Effekte der Grund für den Einbau N-Alkylierter Imidazole in vielen literaturbekannten PFT Inhibitoren sein.[157] Der Austausch eines Wassermoleküls durch einen Imidazol-Liganden wird laut den Berechnungen von Dudev et al. um etwa 3 kcal/mol begünstigt. Diese Rechnungen werden durch die Analyse von Kristallstrukturen aus der Protein Data Bank verifiziert. Wie in Tabelle 8 gezeigt finden sich in Proteinen neben der tetraedrischen Koordination durch 4 Cysteinreste, auch Histidine und Tyrosine. Die experimentellen Abstände entsprechen den erwähnten Berechnungen.

Enzym	PDB Code	Reste	Abstände (in Å)
Alkalische Phosphatase	1ANJ	Zn 450 – His 412	1,90
		Zn 450 – His 331	2,05
		Zn 451 – His 370	2,22
Bruton's Tyrosine Kinase	1BTK	Zn 2 – His 143	2,04
		Zn 2 – Tyr 152 (CG)	4,35
DNA Primase	1D0Q	Zn 151 – His 43	2,28

Tabelle 8: Bindungsabstände und Koordination von Zinkionen in ausgewählten Kristallstrukturen. Die Strukturen wurden der PDB entnommen: Alkalische Phosphatase,[158] Bruton's Tyrosine Kinase,[159] DNA Primase.[160] Die Nummerierungen beziehen sich auf die jeweilige Kristallstruktur.

Neben der Koordination durch Wasser, Thiol oder Imidazol-Liganden ist auch eine Blockade der Zink Bindungsstelle durch aromatische Reste möglich und in der Tat bereits erfolgreich

durchgeführt.[161] Bisher betrachtete experimentelle Daten sowie ab-initio Berechnungen zeigen, dass die Wechselwirkung zwischen einem Kation und einem aromatischen π-System rein elektrostatischer Natur ist.[162,163] G. Petsko et al. zeigten durch Analyse von 33 hochaufgelösten Kristallstrukturen, daß sp^3-Aminogruppen vorzugsweise zwischen 3,4 Å und 6 Å oberhalb der π-Ebene positioniert ist, da hierbei Wechselwirkungen mit dem δ(+)Rand des Aromaten vermieden werden.[164] Als prominente Beispiele für diese Wechselwirkung seien hier die Acetylcholinesterase und die Klasse der Tyrosin-spezifischen Phosphatasen genannt. Auch die Erkennung von Phosphotyrosinhaltigen Peptiden durch die SH2-Domäne erfolgt durch eine Wechselwirkung des aromatischen Rings des Phosphotyrosins mit Arg-155 und Lys-203 dieser Domäne.[110] Die in einigen der PFT Inhibitoren beobachtete Blockade des Zinkions durch aromatische Reste wird auch durch eine derartige Wechselwirkung stabilisiert.[165]

4.3.1.2 Wahl eines manuellen Dockingverfahrens

Ein recht einfaches Verfahren zur Ermittlung potentieller Bindungsmodi ist die Verwendung automatischer Dockingprogramme. Als Input werden lediglich Strukturdaten des Proteins und der zu dockenden Liganden benötigt. Wie in Abschnitt 4.2.5 wurde das Programm GOLD hierfür anfänglich verwendet.[85] Für die Versuche mit GOLD wurden die Strukturen der Verbindungen **109**, **110**, **111**, **112**, **113**, **114**, **115**, (siehe Abbildungen 68 und 69) und von Pepticinnamin E **9** mit den entsprechenden Werkzeugen aus WitnotP erstellt (siehe AAV-MM1) und mit CHARMM minimiert (AAV-MM3). Da GOLD aus der eingegebenen Konformation durch Rotation um frei drehbare Bindungen viele weitere Konformationen erzeugt und mittels des genetischen Algorithmus bewertet, war es hierbei von untergeordneter Bedeutung ob die Anfangskonformationen einem lokalen oder globalen Minimum der potentiellen Energie entsprechen. Für das Docking wurden die vom Hersteller empfohlenen Einstellungen bezüglich der Anfangspopulation sowie der Mutations- und Crossover-Operatoren verwendet. Aus der Kristallstruktur der Ratten-PFT wurden von GOLD die „active atoms“ extrahiert. Jede Verbindung wurde 20 Docking-Experimenten unterworfen. Die von GOLD errechneten Optimalwerte für jede Verbindung wurden anschließend gegen die experimentell bestimmten IC_{50} Werte aufgetragen. Gemäß den Literaturangaben zur Zuverlässigkeit von GOLD[85,86] sollte sich hierbei eine positive Korrelation ergeben. Eine Analyse des GOLD Outputs (siehe Tabelle 9) zeigt, dass bei dem hier durchgeführten Docking der Pepticinnamin E Analoga keine Korrelation zwischen den experimentell determinierten IC_{50} Werten und den Fitness Werten aus der Scoring Funktion besteht. Dies zeigt auch der Korrelationskoeffizient (-0,10).

Verbindung	IC50	Fitness
109	6	73,6
115	8	35,8
110	9	53,9
112	10	70,3
114	16	58,4
9	40	47,4
113	>100	46,9
111	>100	64,5

Tabelle 9: IC_{50} Werte und GOLD-Fitness ausgewählter PFT-Inhibitoren.

Neben den unbefriedigenden Zahlen ist zusätzlich noch festzustellen, dass in einigen Fällen offenbar unwahrscheinliche Konformationen als Resultat erschienen. Betrachtet man die Strukturen der von Pepticinnamin E abgeleiteten Inhibitoren und vergleicht diese mit Literatur-bekannten Inhibitoren und deren Bindungsmodi, kann es als sehr wahrscheinlich gelten, dass das freie Carboxylat nicht in der hydrophoben Bindungstasche für Farnesylpyrophosphat zu finden sein wird. Einige gedockte Konformationen zeigen jedoch genau diese Orientierung. Auch die als Kontrolle gedachten Verbindungen **111** und **113**, die in vitro keine nennenswerte Inhibition der PFT zeigten, wurden mit mittleren bis hohen Fitness-Scores bewertet. Zu den Ursache für diese Fehler zählt neben der Schwierigkeit der Bewertung von hydrophoben Wechselwirkung auch GOLD-spezifische Probleme, die Koordination des Zinks korrekt vorherzusagen und zu bewerten. Bekannt ist, dass GOLD Probleme mit dem Docken hydrophober Verbindungen hat, da die integrierte Scoring Funktion zunächst die Anzahl und Geometrie von Wasserstoffbrücken sowie Coulomb Wechselwirkung berücksichtigt. Hydrophobe Wechselwirkungen werden sekundär bewertet.[85] Während GOLD bei der Anwendung auf Kinasen an der Flexibilität der Enzyme scheiterte, waren hier die hydrophoben Eigenschaften der Inhibitoren für die negativen Resultate ausschlaggebend. Daher wurde auf die Anwendung von automatischen Dockingprogrammen verzichtet. Durch manuelles Docking sollten daher die potentiellen Bindungsmodi ermittelt werden.

4.3.2 Qualitative Analyse der PFT Inhibitoren

4.3.2.1 Bindungsmodus von Pepticinnamin E

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeiten war der Naturstoff Pepticinnamin E **9**,[166] der als Bisubstratinhibitor die Übertragung eines Farnesylrestes auf ein Cystein durch PFT inhibiert.[53] Ausgehend von der Kristallstruktur der Ratten-PFT im Komplex mit CVFM und FPP[167] wurde zunächst der bislang unbekannte Bindungsmodus von Pepticinnamin E **9** untersucht. Der Weg zum Bindungsmodus von Pepticinnamin E an die PFT ist in Abbildung 67 dargestellt. Analog zur Vorgehensweise bei der Analyse der Nakijichinon Analoga

(Kapitel 4.2.3) wurde mittels Kraftfeldrechnung die 3D Struktur von Pepticinnamin E bestimmt. Die Berechnung von der Hydrophobizität der Proteinoberfläche der Farnesyltransferase (PFT) und Pepticinnamin E mit HYDROMAP ergab erste Hinweise auf wahrscheinliche Wechselwirkungen des Naturstoffs mit der PFT. Demnach könnte der 2-Pentenylzimtsäurerest in der unpolaren Farnesylbindungstasche Platz finden, während das sehr polare Diketopiperazin in der Carboxlat-Bindungstasche zu platzieren wäre. Ergänzt wurde dies durch die Überlegung, dass Pepticinnamin E als Bisubstratinhibitor sowohl kompetitiv zu FPP als auch kompetitiv zum CAAX Peptid wirkt und daher beide Bindungsstellen in geeigneter Weise blockieren sollte. Der naheliegendste Ansatz, für Pepticinnamin E aufgrund seiner peptidischen Struktur einen Bindungsmodus anzunehmen, der auf einer Kombination der Bindungsmodi des CAAX-Peptids mit einem kovalent gebundenem FPP-Analogon basiert, erwies sich rasch als falsch. Durch die zweifache N-Methylierung kann Pepticinnamin E keinesfalls in einer Konformation analog zu CVFM oder vergleichbaren Substraten im aktiven Zentrum binden, da in diesem Fall eine intramolekulare van der Waals Abstoßung zwischen diese Methylgruppen resultieren würde. Statt dessen steht der in Abbildung 67 gezeigte Bindungsmodus am Besten mit den vorliegenden Daten im Einklang. Die Plausibilität der hier vorgeschlagenen Turn-Konformation wird durch literaturbekannte Ergebnisse anderer Gruppen bestätigt, wonach N-methylierte Aminosäuren Turn-Konformationen begünstigen.[168]

Nach manuellem Docking, geleitet durch die eben aufgeführten Vorgedanken, wurde der Komplex aus Pepticinnamin E und PFT mit CHARMM minimiert. Diese Vorgehensweise wurde bei allen hier vorgeschlagenen Bindungsmodi und allen untersuchten Inhibitoren angewandt. Wie im experimentellen Teil detailliert beschrieben, war es für die CHARMM Minimierung erforderlich, das Zinkion und die koordinierenden Aminosäuren in ihren Positionen zu fixieren, da in CHARMM Größe und Koordinationsgeometrie des Zn^{2+} Kations nicht ausreichend parametrisiert sind. Die Bindungsmodi der Liganden wurden hierdurch jedoch nicht verfälscht.

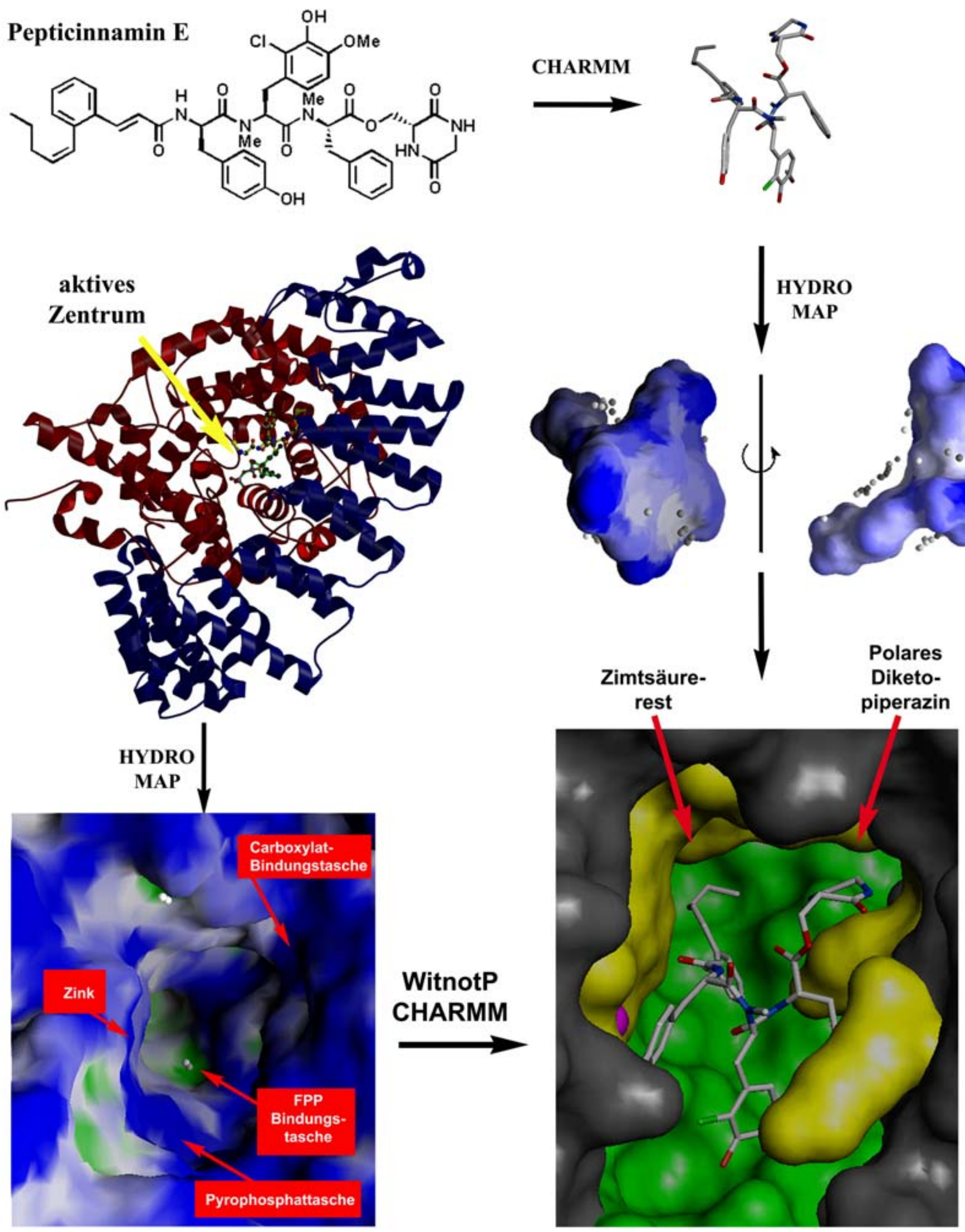


Abbildung 67: Vorgehensweise zur Ermittlung des Bindungsmodus von Pepticinnamin E an die PFT (unten rechts gezeigt).

Entsprechend den eingangs angestellten Überlegungen blockiert der unpolare Zimtsäurerest die FPP-Bindungstasche, während die polareren Tyrosine und das sehr polares Diketopiperazin in hydrophilen Regionen - der Pyrophosphattasche und der Tasche die den C-Terminus des Substratpeptides aufnehmen soll - binden. Die N-terminale Diketopiperazin-einheit bindet über H-Brücken sowohl an Gln 167α als auch an Arg 202α. Diese Wasserstoffbrücken sind auch in der Kristallstruktur zwischen der PFT und dem Peptidsubstrat zu finden. Der Phenylalaninrest füllt eine hydrophobe Tasche zwischen Gln 167α und Tyr 200β. Gemäß diesem Modell müssen sich hierfür sowohl His 201α als auch Tyr 166α geringfügig aus den Positionen in der 1JCR Kristallstruktur verschieben. Auch bei der Bindung des natürlichen Substrates bewegen sich diese beiden Seitenketten, wie durch

den Vergleich der 1FTI und 1JCR Strukturen[152] der PFT ersichtlich wird.[‡‡‡‡‡] Das 2-Chlor-3-hydroxy-4-methoxyphenylalanin liefert einen Bindungsbeitrag durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Tyr 200β und Tyr 251β sowie vier Wasserstoffbrücken mit Arg 291β und füllt dadurch die Pyrophosphatbindungsstelle gut aus. Eine Rotation um die βC-γC Achse wäre denkbar. Das unsubstituierte Tyrosin blockiert den Zugang zum Zinkion. Der Abstand und die Lage des Zinks mittig oberhalb der π-Ebene (~ 3,5 Å) legen eine gute Kation-π Wechselwirkung nahe.

4.3.2.2 Bindungsmodi der Pepticinnamin E Analoga

Aus der von Dr. Michael Thutewohl synthetisierten Bibliothek von Pepticinnamin E Analoga[169] wurden für eine tiefergehend Analyse diejenigen Verbindungen ausgesucht, die in einem biologischen Test eine interessante Aktivität zeigten.[154] Zur Kontrolle wurden auch einige inaktive Verbindungen analysiert. Die biologischen Daten stammen aus einem Fluoreszenz-basierten Assay,[170] in dem, PFT-katalysiert, ein Farnesylrest auf ein Dansyl-markiertes Pentapeptid (Dansyl-GCVLS) übertragen wurde, wobei die letzten vier Aminosäuren des Peptids der CAAX-Box von H-Ras entsprachen. Durch selektive Messung der Produkt-Fluoreszenz mit und ohne Inhibitorzusatz wurde der Inhibitionsgrad bestimmt. Hierbei wurden beide Substratkomponenten und Inhibitor vorgelegt und die Reaktion durch Enzymzugabe gestartet. Bei Verbindungen mit Aktivitäten unter 50 µmol/l wurden die jeweiligen IC_{50}-Werte ermittelt.[169] Diese Substanzbibliothek (Strukturen und IC_{50} Werte sind in Anhang X aufgeführt) kann in drei Substanzgruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe enthielt Pentamere wie Pepticinnamin E. Die zwei anderen Gruppen enthielten Verbindungen die *C*-terminal um einen Baustein verkürzt waren. In einer Gruppe war dabei das Peptidrückgrat konserviert, ein der anderen Gruppe finden sich neben Histidin auch nicht N-methylierte Aminosäuren. Zur Aufklärung der Bindungsmodi und Art der Inhibition der PFT durch die Pepticinnamin E Analoga wurden zunächst die vorhandenen Struktur-Aktivitäts Daten analysiert. Anschließend konnten, entsprechend der in Abbildung 67 illustrierten Methode, die Bindungsmodi einiger Vertreter der Pepticinnamin E Bibliothek untersucht werden.

4.3.2.2.1 Untersuchung der ersten Gruppe: Pentamere der Struktur 116

Die erste Gruppe der in Anhang X gezeigten Verbindungen besteht, wie der Naturstoff aus 5 Monomeren. Das manuelle Docking dieser Verbindungen in das aktive Zentrum der PFT, in einer zu Pepticinnamin E analogen Konformation gab Aufschluß über die Ursachen der fehlenden Aktivität von **116** und **117.**

‡‡‡‡‡ Dies ist graphisch nicht gut darstellbar. Beide Dateien befinden sich auf beliegender CD und können mit RASMOL auf einem PC betrachtet werden.

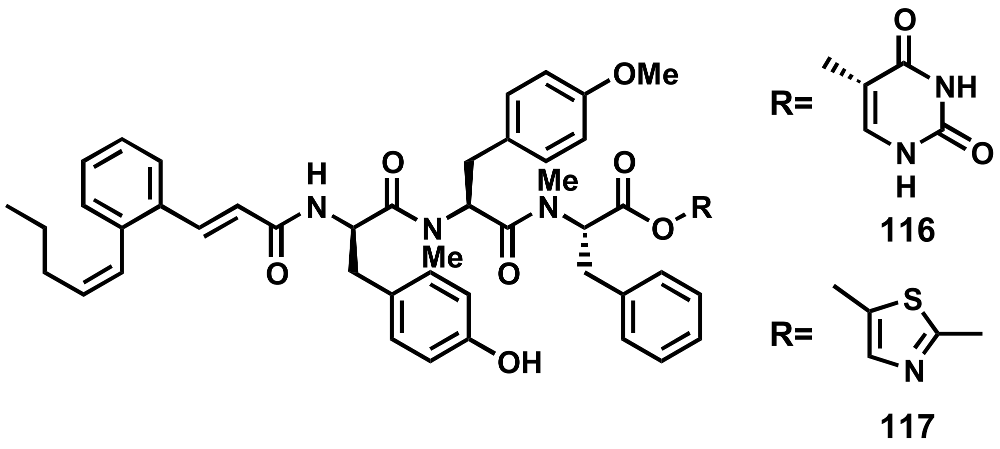


Abbildung 68: Pepticinnamin E Analoga 116 und 117. Das Peptidrückgrat ist identisch zum Rückgrat des Naturstoffs.

Diese ist im Wesentlichen auf den *C*-terminalen Baustein zurückzuführen, die aufgrund der ungünstig ausgerichteten 2'-Carbonylgruppe (**116**) bzw. 2'-Methylgruppe (**117**) nicht gut in die Carboxylatbindungstasche passen. Ebenso störend für die offensichtlich wichtigen Wechselwirkungen zur α-Untereinheit des Enzyms (d.h. der Carboxylatbindungsstelle) der PFT sind hydrophobe Reste am C-Terminus, welche mögliche H-Brücken-Bindungen durch ein Carboxylat verhindern (siehe **130** und **131**), sowie ein zu großer sterischer Anspruch. Letzteres wird insbesondere beim Vergleich von **125** und **126** deutlich. Ein passendes Muster von Wasserstoffbrückendonoren und –Akzeptoren sowie sterische Kompatibilität sind hingegen ursächlich für die gute Affinität von **127** und **132**.

4.3.2.2.2 Untersuchung der zweiten Gruppe: Tetramere mit Naturstoff-identischen Rückgrat

Innerhalb der zweiten Gruppe von Verbindungen, die im Gegensatz zum Naturstoff aus vier Monomeren bestehen und einen freien C-Terminus aufweisen, sind die Verbindungen **110** und **114** bezüglich der gemessenen IC_{50} Werte besonders interessant und wurden daher detailliert untersucht.

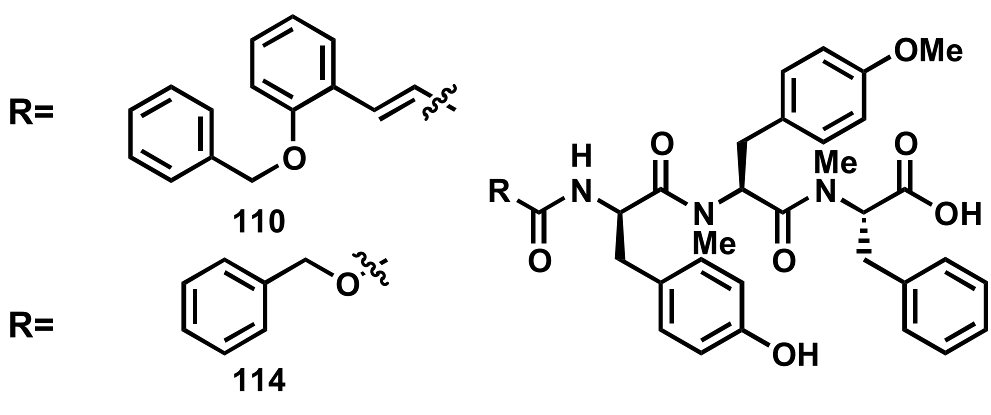
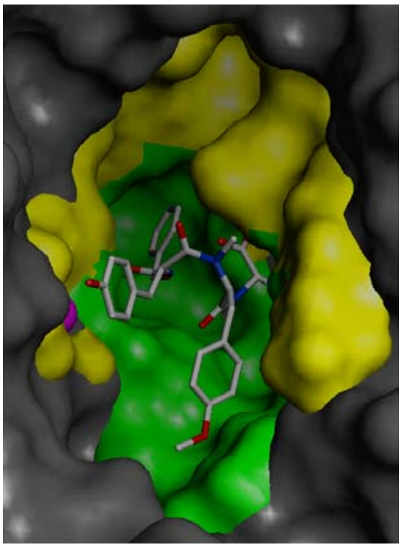


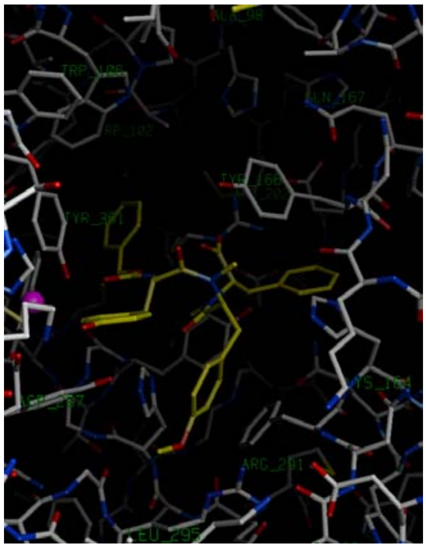
Abbildung 69: C-terminal verkürzte Pepticinnamin E Analoga 110 und 116

Auch für die Untersuchung der biologisch aktiven Mitglieder der Bibliothek von Pepticinnamin E Analoga, gab die mit HYDROMAP erstellte Hydrophobizitätskarte der PFT wertvolle Hinweise. Wie beim Naturstoff sind auch hier sterische Gründe (Wechselwirkung der beiden N-Methylgruppen) als Ursache für eine im Vergleich zum CAAX Peptid veränderte Konformation zu nennen. Bei der Ermittlung der Bindungsmodi dienten auch hier die Hydrophobizitätskarten von **110** und **114** als erste Orientierung (nicht gezeigt). Für das manuelle Docking wurden die Wechselwirkung der freien Carboxylatgruppen mit der durch Arg 202β, Glu 198α und Gln 167α begrenzten polaren Tasche sowie die Blockade der Zink-Bindungstasche durch den N-terminalen Tyrosinrest als Startpunkte betrachtet.

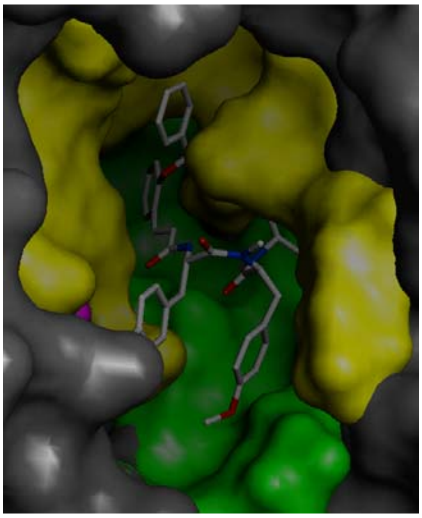
a)



b)



c)



d)

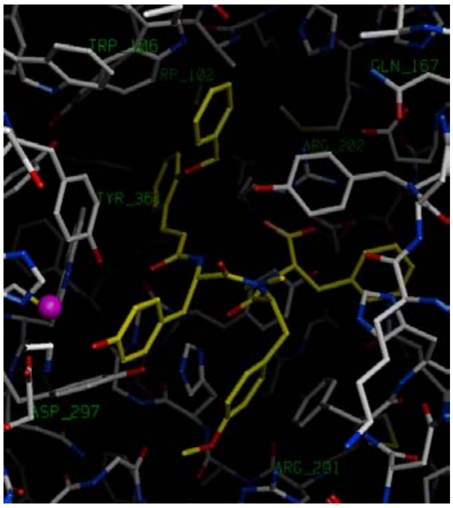


Abbildung 70: Bindungsmodi der Pepticinnamin E Analoga 110 und 114, a) 114 in PFT mit SA Oberflächen b) 114 in PFT, wichtige Aminosäuren sind explizit benannt c) 110 in PFT mit SA Oberflächen d) 110 in PFt, wichtige Aminosäuren sind explizit benannt.

Wie aus Abbildung 70 ersichtlich, binden **110** und **114** in vergleichbarer Weise an PFT. Analog zum Bindungsmodus von Pepticinnamin E blockiert der Methoxyphenylalaninrest die Pyrophosphatbindungstasche wobei gleichzeitig starke Wasserstoffbrücken zu Arg 291β

gebildet werden. Der Abstand des Zn^{2+} zum aromatischen Ring des *N*-terminalen Tyrosins (3,64 Å für **110** und 3,56 Å für **114**) lässt auf eine Wechselwirkung der Kations mit den Elektronen des π-Systems schließend. Die Position des Tyrosins wird des Weiteren durch H-Brücken der phenolischen OH-Gruppe zu Lys 356β und Asp 352β, sowie His 362β fixiert. Die Längen und relevanten Winkel der Wasserstoffbrücken der hier betrachteten Verbindungen sind in aus Gründen der Übersichtlichkeit in Anhang IX zusammengefasst. Letztlich wird die hydrophobe FPP-Bindungstasche durch den Z-Substituenten bzw. *ortho*-Benzyloxyzimtsäurerest effektiv blockiert. Diese hydrophoben Wechselwirkungen wurden in ähnlicher Form beim Bindungsmodus von Pepticinnamin E beschrieben. Die Benzyloxygruppe von **114** trägt zusätzlich noch hydrophobe Wechselwirkungen mit Trp 102β und Trp 106β zur Affinität bei. In diesem Bereich bindet auch die Seitenkette Phenylalanins im CVFM Peptid aus der Kristallstruktur der Ratten-PFT (1JCR). Anstelle der Wechselwirkung mit Gln 167β, bilden die Carboxylatgruppen von **110** und **114** jedoch Wasserstoffbrücken zu Arg 202β und Tyr 550β aus. Vom *ortho*-Benzyloxyzimtsäureamid gehen zwei H-Brücken zu Tyr 361β und Tyr 166α aus. Sowohl bei **110** als auch **114** ist der untere Teil des aktiven Zentrums effektiv blockiert, allerdings ist die Peptidbindungstasche nur teilweise belegt. Insbesondere bewirkt die Verkürzung der Sequenz, dass die Carboxylatbindungsstelle frei bleibt, so dass die gleichzeitige Bindung eines CAAX Peptides durchaus möglich wäre. Aus den hier beschriebenen Bindungsmodi für Mitglieder der Bibliothek mit Naturstoff-identischem Rückgrat folgen auf sehr deutliche Weise auch Erklärungen für die Aktivitätsunterschiede innerhalb der in Tabelle 1 gezeigten Verbindungsreihe. Interessant ist, dass bei **121**, **111** und **113** trotz freiem C-Terminus und sonstiger Identität zu **110** keine Inhibition beobachtet wurde. Dockt man diese Verbindungen in einer zu **110** analogen Weise in das aktive Zentrum der PFT ein, überlappen die *meta* und *para* Substituenten der Zimtsäure mit Cys 206β oder Tyr 205β. Diese Abstoßung dürfte Ursache für die fehlende Aktivität in beiden *in vitro* Assays sein. Auch die Abstufung in der Aktivität von **134** und **128** über **129** bis **114** lässt sich mit diesem Bindungsmodell sehr gut erklären. Während für **114** eine intramolekulare H-Brücke zwischen dem Carbamat O und der C-OH Gruppe des Carboxylats in Frage kommt, fehlt diese Option bei den schwächer bindenden Analoga. Hydrocinnamoyl- und Zimtsäurerest erfordern des Weiteren eine leicht veränderte Geometrie, welche die Bindung in der FPP Bindungstasche schwächt. Letztlich ist bei **134** die Nitrogruppe für eine repulsive Wechselwirkung mit Cys 206β, Ala 450β und Arg 401β für die im Vergleich zu **114** reduzierte Affinität verantwortlich.

Beim hier gezeigten Bindungsmodus bleiben weite Teile der Peptidtasche frei, insbesondere die Carboxylatbindungsstelle ist, wie erwähnt, unbesetzt. Eine gleichzeitige Bindung von Inhibitor und CAAX Peptid wäre möglich, wenngleich die Koordination des Cysteins an das Zink sicher verhindert wäre. Nach diesem Bindungsmodell, sollten **110** und **114** zwar zu FPP kompetitiv wirken, nicht aber zu einem CAAX-Peptid. Eine Überprüfung dieses Bindungsmodells durch kinetische Untersuchungen bestätigte diese Vorhersagen in vollem

Umfang.[154] Dies kann im Zusammenhang mit der in Abschnitt 4.3.3 beschriebenen quantitativen Analyse als Beleg für die Richtigkeit des vorgeschlagenen Bindungsmodus gelten.

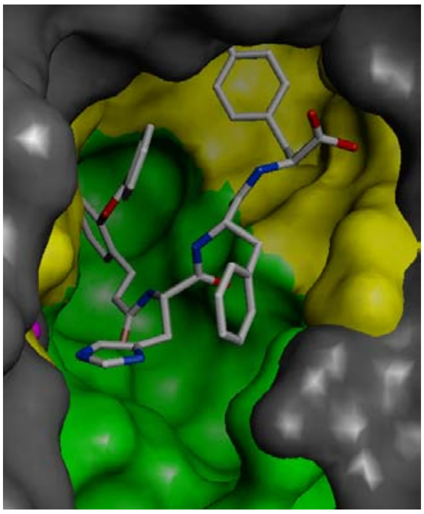
4.3.2.2.3 Untersuchung der dritten Gruppe: Tetramere mit modifiziertem Rückgrat

Auch für diese dritte Gruppe von Verbindungen wurden zunächst einfache Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aufgestellt. Ein Vergleich der N-terminalen Substituenten bei den Verbindungen **111**, **121**, **113**, **114**, **126**, **127** und **128** zeigte, dass eine *para*-Substitution der Phenylpropionyl- oder Cinnamoyl-Reste zu einer Abnahme der Aktivität führte. Die Verbindungen **112**, **147**, **148**, **149** und **158** hingegen, zeigen trotz eines Substituenten in dieser Position eine recht gute Inhibition. Dies legt einen grundsätzlich anderen Bindungsmodus nahe. Neben der Einführung eines Histidins könnte dies durch die fehlende 2-fache *N*-Methylierung bedingt sein. Analog zur Verfahrensweise bei den Verbindungen aus Tablle 17 (Anhang X) wurden für die Ermittlung des wahrscheinlichsten Bindungsmodus die Hydrophobizitätskarten analysiert und des weiteren die Annahmen einer Wechselwirkung des Histidins mit den Zinkion sowie des freien Carboxylates mit der durch Arg 202β, Glu 198α und Gln 167α begrenzten polaren Tasche getätigt. Wie bei den Verbindungen mit „Naturstoff-Rückgrat“ gelang es auch für die Analoga mit abgewandeltem Rückgrat diese Struktur-Aktivitäts-Daten mittels Molecular Modelling zu rationalisieren.

Zunächst wurde die Gruppe der einfach N-methylierten Verbindungen untersucht. Der für Verbindung **109** vorgeschlagene Bindungsmodus (repräsentativ für diese Gruppe) ist in Abbildung 71 gezeigt. Das Histidin koordiniert an das Zinkatom, wobei Koordinationsgeometrie und Bindungsabstand (2,4 Å) Literaturwerten recht nahe kommen.[156] Die freie Carboxylatgruppe bildet eine Wasserstoffbrücke mit Gln 167α. Diese Wasserstoffbrücke findet sich auch im Komplex der PFT mit dem natürlichen CAAX Substrat. Gut zu erkennen ist, das der *meta*-Benzyloxycinnamoylrest einen Teil der Bindungstasche für FPP blockiert und zugleich die hydrophobe Wechselwirkung die im natürlichen Substrat zwischen der zweiten unpolaren Aminosäure und Trp 106β, Trp 102β, Trp 303β und Tyr 361β ausgeht, imitiert. Das C-terminale Tyrosin von **109** bildet eine Wasserstoffbrücke zum Backbone von Ala 98α, das zusammen mit Pro97α für die Bindung der Seitenkette der C-terminalen Aminosäure besonders wichtig ist. Neben der hydrophoben Wechselwirkung zwischen dem Phenylalanin und der Alkylkette Lys 164α trägt auch eine Wasserstoffbrücke des Inhibitorbackbones zu Tyr 166α zur guten Bindung an die PFT bei. Die im Rahmen diese Projektes durchgeführten Untersuchungen ergeben für die Verbindungen **109, 155**, **156**, **147**, **158**, und **159** einen ähnlichen Bindungsmodus. Das gleiche Grundgerüst findet sich auch bei Verbindung **143**. Die Position der polaren Nitrogruppe in der hydrophoben Tasche ist jedoch weniger vorteilhaft und dürfte zusammen mit der fehlenden Wechselwirkung mit Trp 102β und Trp 106β ausschlaggebend für die reduzierte Affinität von **143** sein. Die Tatsache, dass bei dieser Subbibliothek große Substituenten in *para*-Stellung des *N*-terminalen Z oder

Hydrocinnamoylrest nicht zu einem Verlust an Aktivität führen, wie dies für die zweifach methylierten Analoga (Tabelle 17, Anhang X) der Fall war, ist nach diesem Bindungsmodell auf die geänderte Backbonekonformation zurückzuführen, die etwas mehr Raum für solche Substituenten in der hydrophoben Tasche lässt.

a)



b)

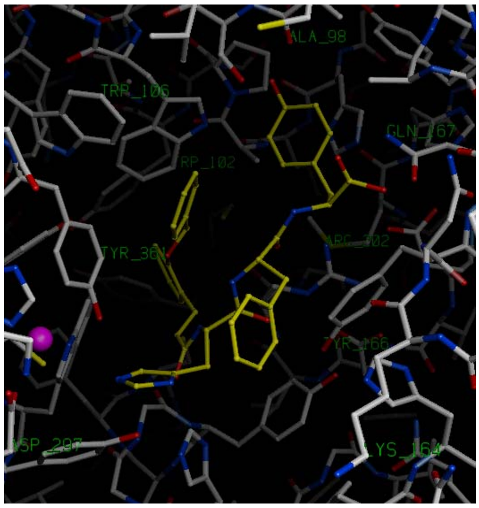


Abbildung 71: a) 109 in PFT mit SA Oberflächen b) 109 in PFT, für die Bindung wichtige Aminosäuren sind explizit bezeichnet.

Die hier für Verbindung **109** gezeigte Position, bei der sowohl Teile der FPP- als auch der CVLS-Bindungstasche belegt werden, lässt auf eine Wirkung dieser Verbindung als Bisubstratinhibitor schließen. Gleiches gilt für Verbindungen **109, 155**, **156**, **147**, **158**, und **159**.[154] Eine Überprüfung dieser Vorhersage mittels kinetischer Studien bestätigte dieses das Bindungsmodell.

Das Fehlen einer zweiten *N*-Methylgruppe macht für einige Verbindungen aus Tabelle 18 (Anhanb X) eine zur natürlichen Peptidsubstrat analogen Bindungskonformation möglich. Der zu **109** differierende Bindungsmodus für **142** und **112** ergab sich aus der Tatsache, dass die strukturell eng verwandte Verbindung **154** nicht zufriedenstellend in einer zu **109** analogen Weise in das aktive Zentrum der PFT gedockt werden konnte. Aus der Analyse der HYDROMAP Oberfläche war die Existenz weiterer hydrophober Taschen bekannt. Daher wurde versucht, **112** und **115** so in das aktive Zentrum einzufügen, dass das *C*-terminale Tyrosin die vor der Pyrophosphattasche gelegene hydrophobe Stelle belegte. Die Überlagerung des Peptidbackbones mit dem des CVLS-Peptids aus der 1JCR Struktur zeigte die Möglichkeit auf, dass hier ein Bindungsmodus vorliegen könnte, der keine kompetitive Bindung zu FPP beinhaltet. Durch das Histidin ist zwar für weitere Substrate der Zugang zum Zink blockiert, aber eine Blockade der FPP-Tasche ergibt sich aus diesem Vorschlag nicht. In analoger Weise wäre für **142** und **112** ein zweiter Bindungsmodus denkbar: Der *para*-Pentylhydrocinnamoylrest erreicht die zweite hydrophobe Tasche, die durch Leu 295β, Val 43β, Lys 198α, sowie Lys 164α definiert ist, wobei der Phenylring eine Kation-π-Wechselwirkung mit Lys 164α eingeht. Die gleiche Tasche wird bei **154** durch den zweiten

Phenylring ausgefüllt. Die genannte Aminosäuren sind in Abbildung 72b unten rechts beschriftet.

a) b)

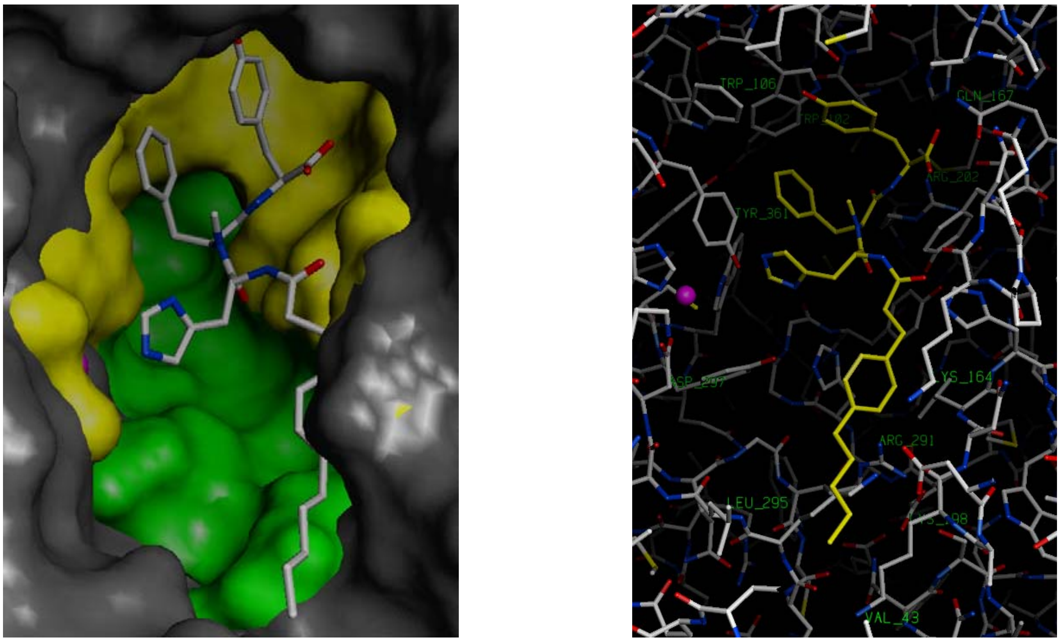


Abbildung 72: a) 112 in PFT, mit SA Oberflächen, b) 112 in PFT, für die Bindung wichtige Aminosäuren sind explizit bezeichnet.

Im Gegensatz zu **114** und **142** zeigt **135** keine ausgeprägte Wechselwirkung mit der PFT. Der Einfluß der N-Methylierung auf die Konformation des Backbones konnte ebenso erklärt werden, wie die Folgen einer Substitution eines Tyrosins durch ein Histidin. Analog zum bereits erwähnten Unterschied zwischen **142** und **135** ist auch die Differenz zwischen **146** und **145** auf die fehlende starke Koordination des Zinks durch das Histidin zurückzuführen.

Gestützt wurde die Vermutung eines anderen Bindungsmodus durch die kinetischen Daten wonach **112** und **115** nicht FPP kompetitiv wirken. In diesem Fall wurden die kinetischen Untersuchungen parallel zu den Molecular Modelling Studien durchgeführt. Aus den Modelling Untersuchungen alleine, wäre eine Präferenz für einen der beiden denkbaren Bindungsmodi hier nicht abzuleiten gewesen. Auf Basis aus kinetischen Daten und Modelling Arbeiten abgeleiteten Bindungsmodus lässt sich auch erklären warum **111** und **113** trotz sehr ähnlicher Struktur, keine Inhibition der PFT zeigen. Zwischen den beiden N-Methylgruppen des Rückgrates käme es zu einer sterischen Abstoßung. **111** und **113** können die für **109** gezeigte Konformation nicht einnehmen.

4.3.3 Quantitative Analyse der Pepticinnamin E-Analoga

Die bisher aufgeführten qualitativen Erklärungen für die biologischen Aktivitäten einiger Pepticinnamin E Analoga sollten durch quantitative Beschreibungen untermauert werden. In einer Vorgehensweise, wie sie bereits für die Analyse der Nakijichinon Analoga angewandt wurde (Kapitel 4.2.6), konnten die Wechselwirkungen zwischen den Pepticinnamin E

Analoga und der PFT charakterisiert werden. Neben der Zahl und Geometrie der Wasserstoffbrücken wurden hydrophobe Wechselwirkungen betrachtet. Diese Analyse ist für die Weiterentwicklung dieser Verbindungsklasse ebenso wichtig, wie das qualitative Verständnis der Wirkung.

4.3.3.1 Der Beitrag von Wasserstoffbrücken bei der Bindung von Inhibitoren an die Farnesyltransferase

Einige automatische Dockingprogramme (GOLD oder LUDI) bewerten die Stärke von Wasserstoffbrücken anhand geometrischer Abweichung von statistisch aus Kristallstrukturen abgeleiteten Idealwerten, meist ergänzt um diverse Korrekturfaktoren.[89] Diese älteren Scoring-Modelle oder kürzlich vorgeschlagene[75] konnten nicht in WitnotP integriert werden, so dass stattdessen ein manueller Abgleich mit den als ideal betrachteten Werten vorgenommen wurde. Ähnlich wie bei der Betrachtung der Kinase-Inhibitoren diente diese Analyse in einem iterativen Prozess der Verfeinerung der Bindungsmodi. Gemäß AAV-MM13 wurden die Wasserstoffbrücken zwischen PFT und den Pepticinnamin E Analoga bestimmt. Die Werte sind, zusammen mit den relevanten Literaturwerten in Anhang IX aufgeführt. Daraus wird ersichtlich, dass die hier gefundenen Längen und Winkel in den meisten Fällen den in der Literatur als optimal betrachteten Werten entsprechen.[89,171-174] Auf eine Einzelanalyse aller Wasserstoffbrücken sei an dieser Stelle zugunsten der Lesbarkeit verzichtet. Es sei jedoch angemerkt, dass insbesondere die Wasserstoffbrücken zu den Resten in der Carboxylatbindungsstelle bei allen Inhibitoren nur minimal von den Idealwerten im Bezug auf Länge und Winkel abweichen. Besonders starke Wasserstoffbrücken sind in Anhang IX mit „A" gekennzeichnet.

4.3.3.2 Der Beitrag hydrophober Wechselwirkungen bei der Bindung von Inhibitoren an die Farnesyltransferase

Die zuvor beschriebenen gedockten Konformationen der PFT Inhibitoren geben bei einer visuellen Analyse, d.h. Überlagerung von Kristallstruktur mit Peptid und FPP einerseits und Protein und Inhibitor andererseits, bereits Aufschluss über den zu erwartenden Inhibitionstyp. In Abbildung 73 ist eine solche Überlagerung gezeigt. Es ist gut zu erkennen, dass Pepticinnamin E sowohl Teile der Peptidbindungsregion als auch Teile der FPP Bindungstasche belegt. Diese steht mit der Wirkung als Bisubstratinhibitor in vollem Einklang.

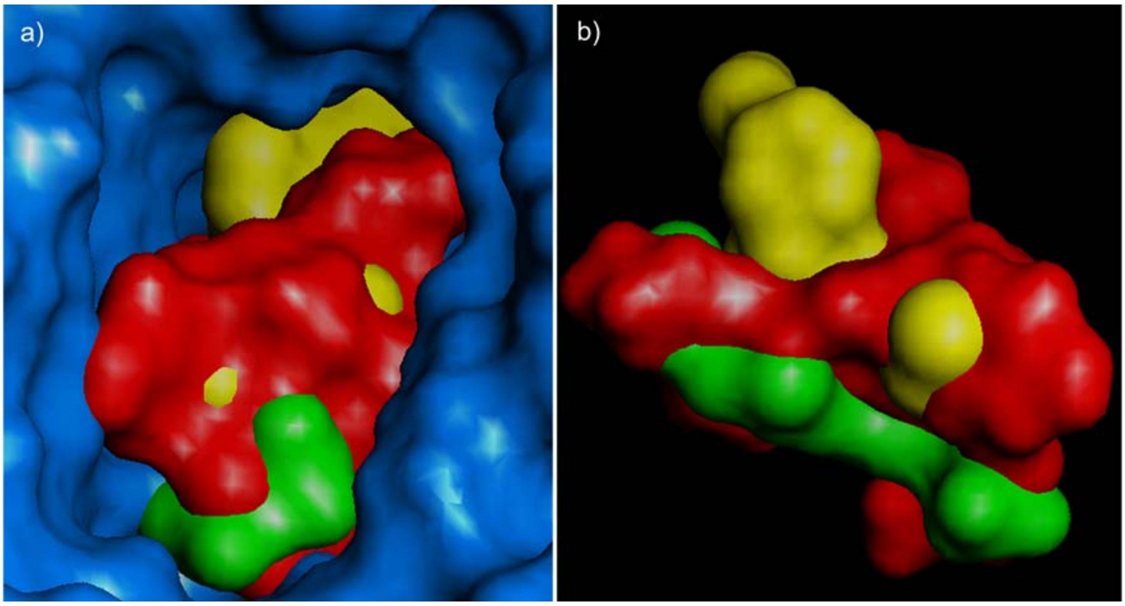


Abbildung 73: a) Pepticinnamin E (rot), CVIM Peptid (gelb) und FPP (grün) im aktiven Zentrum der PFT, b) Seitliche Ansicht, ohne Proteinoberfläche.

Für die Quantifizierung hydrophober Wechselwirkungen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Methode entwickelt, die in leicht abgewandelter Form bereits bei der Analyse der Nakijichinon-Analoga beschrieben wurde. Basierend auf der Annahme, dass die Farnesylpyrophosphat-Bindungstasche der PFT für FPP im Laufe der Evolution optimiert wurde, wurde der Grad der Überlappung des vdW-Volumens des Inhibitors mit dem vdW-Volumen von FPP als Maß für die Stärke der hydrophoben Wechselwirkung verwendet (siehe auch Experimenteller Teil) und gleichzeitig als Indiz für eine FPP-kompetitive Inhibition gewertet. Ebenso unterlag die Fähigkeit der PFT, eine CAAX Sequenz von anderen Sequenzen zu unterscheiden, einem deutlichen Selektionsdruck. Im Laufe der Evolution dürfte daher auch diese Bindungstasche optimiert worden sein. Daher diente das Ausmaß der Überlappung eines Inhibitors mit dem Peptid CVFM aus der Ratten PFT Kristallstruktur als Maß für die Stärke der Wechselwirkung mit der PFT, sowie als Indiz für eine mögliche Peptid-kompetitive Wirkung. Dieser Ansatz erlaubt eine separate Betrachtung beider Bindungsregionen. Während bei der Beschreibung der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Nakijichinon Analoga und Kinasen die hydrophobe Tasche von natürlichen Substraten nicht belegt wird, und daher die Größe der Tasche mit PASS und PQMS (siehe Experimenteller Teil) berechnet werden musste, konnte hier ein anderer Ansatz verfolgt werden. Das Vorliegen von Kristallstrukturen mit FPP und Peptidsubstrat erlaubt eine einfachere und gleichwohl elegante Vorgehensweise. Diese ist zudem hier auch exakter, da im Gegensatz zur klar definierten hydrophoben Tasche der Kinasen, die FPP- und Peptid-Bindungsregionen in der PFT nicht so scharf und ohne Willkür von einander zu trennen sind. Anstelle einer Neuberechnung der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Enzym und Ligand durch Addition aller enthalpischen und entropischen Effekte wird in diesem Verfahren

ein Ligand in Relation zu einem biologisch bereits als „bindend“ validierten Substrat bewertet.

Programme wie WitnotP oder PQMS sind in der Lage, vdW-Oberflächen von Molekülen zu berechnen und darzustellen. Aus dem für die graphische Darstellung berechneten Satz von Koordinaten lässt sich ebenfalls das vdW-Volumen eines solchen, unter der vdW-Oberfläche verborgenen Moleküls berechnen. Besetzt nun ein Inhibitor beispielsweise die Bindungstasche für Farnesylpyrophosphat, so kann man nach Übereinanderlegen der Strukturen des Inhibitors und des Farnesylpyrophosphates in der Proteinstruktur sowohl das Volumen der einzelnen Verbindungen berechnen als auch das Volumen, das beide Moleküle besetzen. Die in Tabelle 10 angegebenen Prozentwerte wurden folgendermaßen errechnet: Das vom Inhibitor und FPP gemeinsam belegte Volumen ergibt sich aus:

$$\text{Überlappungsvolumen } (V_{gemein}) = \text{Volumen}_{Inhibitor} + \text{Volumen}_{FPP} - \text{Volumen}_{(Inhibitor+FPP)}$$

Dividiert man das Resultat durch das van der Waals-Volumen von FPP erhält man den angegebenen Prozentwert. Für das CAAX Peptid wurde in analoger Weise verfahren. Die Relation dieses Schnittvolumens zum Volumen des FPP, zeigt an in welchem Ausmaß die FPP Bindungstasche besetzt ist. Der Prozentwert kann als Maß dafür betrachtet werden, wie gut die Bindungsstelle für einen Liganden ausgefüllt wird. Das gleiche Vorgehen ist natürlich auch auf alle Enzyme anwendbar bei denen eine Struktur mit dem natürlichen Substrat im aktiven Zentrum vorliegt. Die nach dieser Methode (siehe auch AAV-MM12) berechneten Werte für die hier betrachteten Mitglieder der Pepticinnamin E Bibliothek sind in Tabelle 10 dargestellt. Während die Peptid-kompetitive Wirkung von **142** und **112** sehr deutlich wird, zeigt sich beim Vergleich der IC_{50} Werte von **129**, **114** und **110** mit denen der 3. Gruppe (Bisubstratinhibitoren), dass Wechselwirkungen mit Resten der Peptidbindungsregion zwar Affinitäts-steigernd wirken, Werte unter 30 % jedoch nicht ausreichen, einem CAAX-Peptid den Zugang zum aktiven Zentrum zu versperren. Dies war bereits bei der qualitativen Analyse festzustellen. Wie aus Tabelle 10 ersichtlich, können die berechneten überlappenden Volumina gut mit den kinetischen Daten korreliert werden. Neben der zuvor diskutierten Stärke der Wasserstoffbrücken, stellt dieser Ansatz eine sehr einfache aber dennoch zuverlässige Möglichkeit dar, die Bindung hydrophober Teile zu quantifizieren.

	% Ausfüllung des FPP Volumens	FPP komp[a)]	% Ausfüllung des Peptidvolumens	Peptid komp.[a)]
CAAX kompetitive Inhibitoren				
112	0	-	65	+
115	0	-	65	+
FPP kompetitive Inhibitoren				
114	69	+	27	-
110	63	+	19	-
129	75	+	15	-
130	63	+	18	-
Bisubstratinhibitoren				
109	35	+	65	+
156	32	+	54	+
124	62	+	42	+
157	36	+	50	+
9	55	+	54	+

Tabelle 10: Korrelation der Überlappungsvolumina der Inhibitoren mit Fpp bzw. CVLS Peptid. Die (nicht)-kompetitive Wirkung ist durch + oder – gekennzeichnet. Vorhergesagte, aber gegenwärtig noch nicht experimentell bestimmte kinetische Eigenschaften sind rot unterlegt. [a)]: bestimmt durch kinetische Messungen.[154]

4.3.4 Optimierung – Design einer 2. Generation von Analoga

Das Ziel der Verbesserung der Affinität der Pepticinnamin E-Analoga zur PFT, sowie die Steigerung der Selektivität dieser Klasse von PFT-Inhibitoren schließt sich an die abgeschlossenen Synthesen und Molecular Modelling Analysen an. Bedingt durch den modularen Aufbau kann man bei den Pepticinnamin E Analoga leicht Modifikationen einführen um Affinitäten und Selektivitäten im Bezug auf PFT und GGTase I/II zu verbessern. Neben der langfristigen Perspektive als „Drugs“ sind diese Verbindungen als „Molekulare Werkzeuge“ zur weiteren Beleuchtung der in Kapitel 2 erwähnten Signalkaskaden interessant. Insbesondere sind Bisubstratinhibitoren viel versprechend, da man von ihnen eine erhöhte Aktivität und Selektivität erwarten kann.[34] Die vorliegende Analyse der Bindungsmodi der Pepticinnamin E-Analoga auf Basis manuellen Dockings und unterstützender kinetischer Daten ermöglicht nun optimierte Inhibitoren der 2. Generation zu entwerfen. Hierbei können gezielt verbesserte Bisubstratinhibitoren aber auch Fpp kompetitive oder CAAX-kompetitive Inhibitoren entworfen werden, die sich für eine detailierte Untersuchung zellulärer Vorgänge bestens eignen.

4.3.4.1 Ansatzpunkte für Optimierung

Im Verlauf der biologischen Evaluierung zeigte sich, dass die eingeschränkte Löslichkeit einiger Verbindungen ihre Evaluierung beeinträchtigten. M. Thutewohl beschreibt in seiner

Dissertation Abweichungen zwischen zwei verschiedenen PFT-Assays.[169] Diese Resultate, sowie einige Resultate eines Apoptose-Assays könnten unter Anderem auf die unterschiedlichen Löslichkeiten zurückzuführen sein. Für den Einsatz kompetitiver Inhibitoren in zellulären Systemen wäre eine Aktivität im nanomolaren Bereich wünschenswert. Auch hier besteht also Optimierungsbedarf. Für eine Anwendung in einem ganzen Organismus wären weitere Kriterien zu erfüllen. Die von C. Lipinksi[55] aufgestellten und als „Pfizer Rule of 5“ bekannt gewordenen Regeln sagen voraus, dass eine schlechte Aufnahme bzw. Wirkung eines Medikaments zu erwarten ist, wenn im Molekül mehr als 5 Wasserstoffbrückendonoren und 10 Wasserstoffbrückenakzeptoren vorliegen, das Molekulargewicht über 500 g/mol liegt und der CLogP Wert über 5 liegt. Die Lipinski Regeln wurden kürzlich durch K.D. Kopple ergänzt und modifiziert.[175] So scheint das Molekulargewicht von 500 eine weniger kritische Grenze für die unvermittelte Aufnahme in Zellen zu sein. Vielmehr werden Verbindungen mit 10 oder mehr frei drehbaren Bindungen und mehr als 12 Wasserstoffbrückendonoren und –akzeptoren schlecht aufgenommen. Letztere Einschränkung begrenzt die polare Oberfläche, die laut Kopple besser mit der Verfügbarkeit korreliert als die Lipophilie. Frei drehbare Bindungen sind solche, nicht terminalen Bindungen zwischen nicht H-Atomen. Amidbindungen wurden hier aufgrund der eingeschränkten Rotation nicht mitgezählt. Zahlreiche Veröffentlichungen in den letzten Jahren belegen die Bedeutung der LogP Werte für die Verfügbarkeit und Wirksamkeit von potentiellen Wirkstoffen und Inhibitoren. Der recht genauen Berechnung der ClogP Werte wird dabei der Vorzug vor der experimentellen Bestimmung gegeben.[56,92,176] Auch wenn das unmittelbare Ziel der Optimierung der Pepticinnamin E Analoga nicht „orale Bioverfügbarkeit in der Ratte oder dem Menschen“ lautet, ist es dennoch sinnvoll diese Regeln zu beachten, denn einem Einsatz in diversen in vitro Assays könnte auch ein Einsatz in zellulären oder tierische Testsystemen folgen, da auch hier die Konsequenzen einer PFT oder GGTase Inhibition nicht sehr gut verstanden werden. Aus den vorangegangenen Analysen und den Lipinski/Kopple Regeln ergaben sich folgende Ansatzpunkte für die Optimierung:

1) Reduktion der Zahl frei drehbarer Bindungen
2) Verstärkung hydrophober Wechselwirkungen
3) Verbesserung der Löslichkeit in wässrigen Medien
4) Steigerung der Zahl Stärke der Wasserstoffbrücken (unter Beachtung der Lipinski/Kopple Regeln)
5) Verstärkung der Bindung von Histidin an Zn^{2+}

4.3.4.2 Reduktion der Zahl frei drehbarer Bindungen

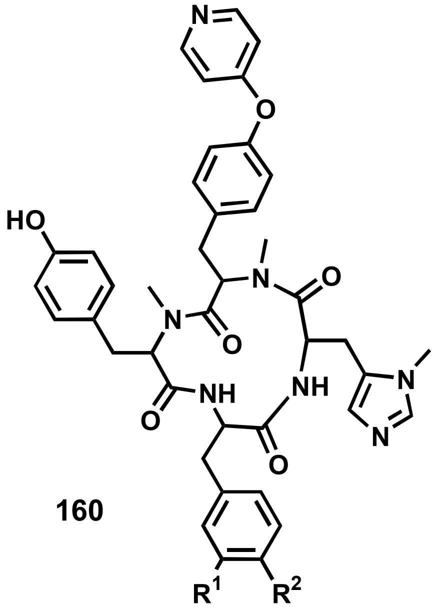
Wie in Tabelle 13 gezeigt, weisen die Pepticinnamin E Analoga bis zu 27 frei drehbare Bindungen auf und sind damit weit von den gemäß Lipinski und Kopple als ideal definierten „10 bis 12“ entfernt. Eine Einschränkung dieser Flexibilität könnte entweder durch Einführung starrer Bausteine in die Kette oder durch Cyclisierung erfolgen. Die

Konformation der hier diskutierten peptidischen PFT Inhibitoren kann in einigen Fällen mit einer β-Turn Konformation vergleichen werden. Die Anwendung von β-Turn Mimetika ist ein oft beschrittener Weg um zu bioverfügbaren Inhibitoren zu gelangen.[63] Neben Benzodiazepinen gehören u.a. auch cyclische Peptide zu den β-Turn Mimetika.

Da manche cyclische Tetra-, Penta- oder Hexapeptide in Abhängigkeit von der Sequenz synthetische Probleme bereiten können und die bereits etablierte Chemie für die Synthese optimierter PFT-Inhibitoren weiterhin verwendet werden sollte, wurden die in Abbildung 74 gezeigten 14-16 gliedrigen Ringsysteme am Computer untersucht. 14-gliedrige Makrocyklen sind aufgrund geringer Ringspannung nicht nur synthetisch besser zugänglich als beispielsweise zyklische Tetrapeptide, sondern ermöglichen die Erhaltung einer β-Turn ähnlichen Konformation, wobei die Alkylkette auch zur Beeinflussung der Löslichkeit bzw. in späteren Phasen biologischer Evaluierung zur Beeinflussung die Bioverfügbarkeit modifiziert werden könnte.[63]

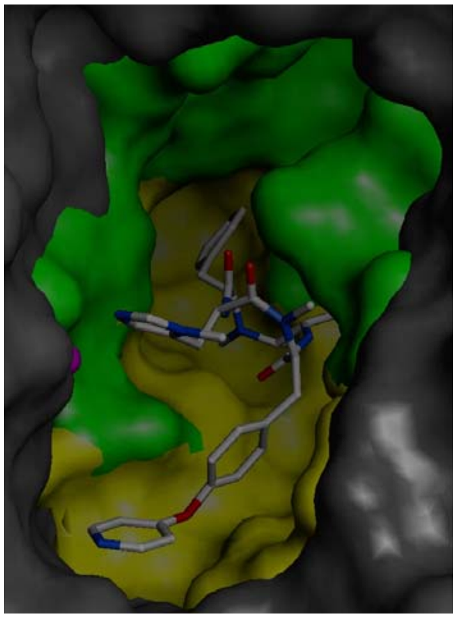
4.3.4.3 Mögliche Grundstrukturen für eine zweite Generation

a)

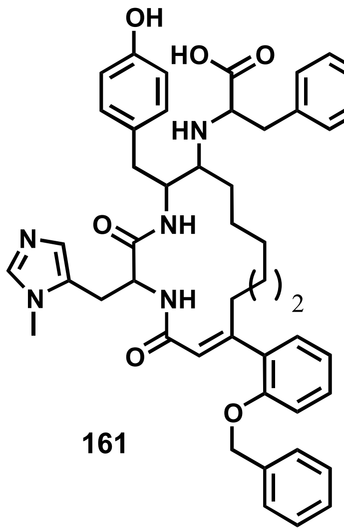


160

b)

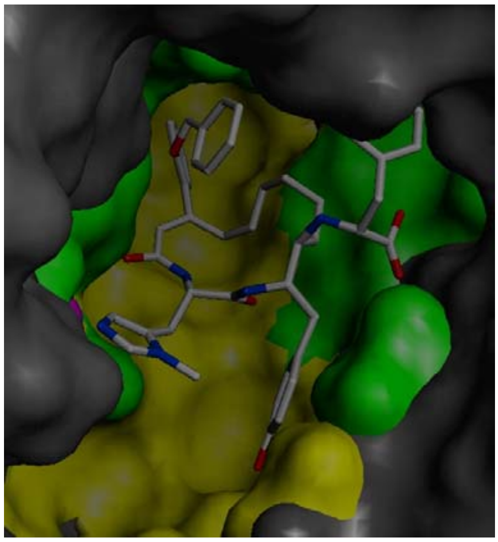


c)

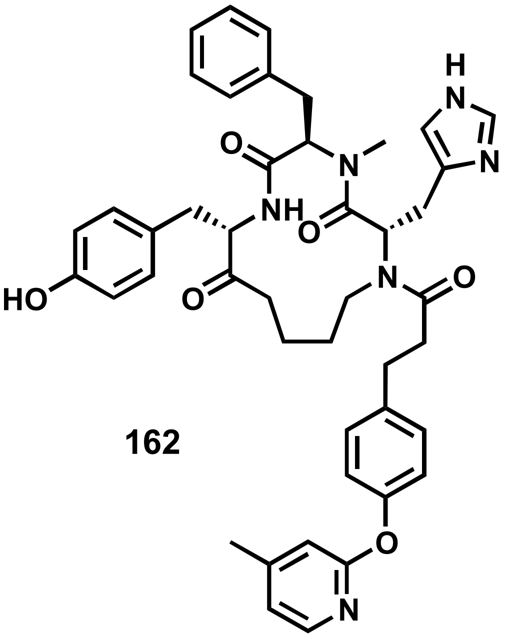


161

d)



e)



162

f)

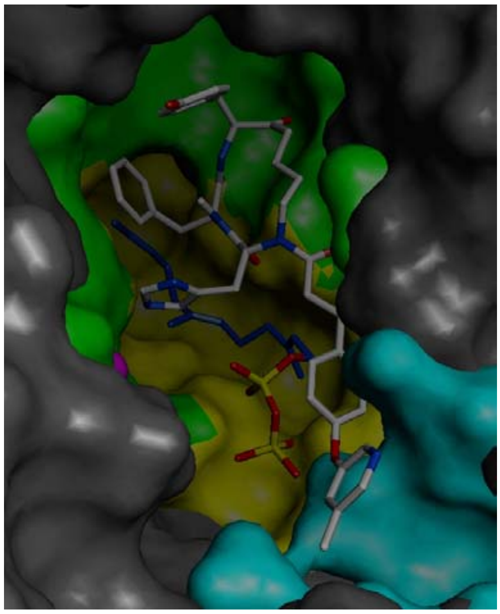


Abbildung 74:Optimierungsvorschläge, a+b) FPP-kompetitiver Inhibitor, c+d) Bisubstratinhibitor e+f) Peptid-kompetitiver Inhibitor

4.3.4.4 Verstärkung hydrophober Wechselwirkungen

Eines der Ziele der Optimierung ist die Verstärkung der Affinität, auch durch Verbesserung hydrophober Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und PFT. Die Quantifizierung wurde hier in der bereits beschriebenen Weise durchgeführt (siehe Kapitel 4.3.3.2). In Tabelle 11 sind die entsprechenden Werte für die in Abbildung 74 gezeigten Vorschläge aufgeführt. Durch Vergleich mit den Werten aus Tabelle 10 wird ersichtlich, dass die optimierten Inhibitoren nicht nur ein besseres Ausfüllen der beiden Taschen erreichen, auch die vordere hydrophobe

Tasche wird von 162 belegt. Nach Abschluß dieser Arbeiten wurden die Belegung dieser Tasche in unabhängigen Arbeit von Schlitzer et al. ebenfalls vorgeschlagen[161]

Optimierte Inhibitoren	% FPP Tasche	% CAAX Tasche	% vordere Tasche
160 (FPP komp)	62	32	0
161 (Bisub)	41	64	0
162 (CAAX komp)	0	51	25

Tabelle 11: Ausfüllung von Bindungstellen in der PFT durch die vorgeschlagenen, optimierten Inhibitoren.

Begrenzend auf die weitere Einführung lipophiler Reste wirkt das Ziel die Löslichkeit zu verbessern. Die vorgeschlagenen Strukturen stellen einen Kompromiss zwischen diesen Zielen dar.

4.3.4.5 Verbesserung der Löslichkeit in wässrigen Medien

Wenngleich die hohe Hitrate aus der Bibliothek von Pepticinnamin E Analoga ermutigend war, sind die Resultate aus dem Apoptose Assay nicht eindeutig. Die hier von Dr. O. Müller verwendeten MDCK-13 Zellen sollten eigentlich nur bei Beeinflussung des Ras-Signalweges in einen programmierten Zelltod übergehen.[154]

Verbindung	CLogP
110	8,49
113	9,07
111	9,17
121	8,45
120	8,49

Tabelle 12: Inhibitoren, die Apoptose von MDCK-13 Zellen auslösen

Wie aus Tabelle 12 ersichtlich weisen alle Verbindungen die im Zellassay Apoptose auslösten einen sehr hohen ClogP Wert auf. Gleichzeitig zeigen die Verbindungen **111**, **121** und **113** keine Inhibition von PFT und GGTase I, was den Vorhersagen der Molecular Modelling Arbeiten entspricht. Lediglich **120** wies eine sehr schwache PFT Inhibition in einem der beiden Assays (aber nicht in einem Zweiten) auf. Diese Verbindung könnte gemäß den oben diskutierten Bindungsmodi sehr wohl in das aktive Zentrum der PFT passen, allerdings wäre aufgrund der Analogie zu **110** eine deutlich schwächere Bindung zu erwarten. Die IC_{50} Werte bestätigen auch hier die Vorhersagen der Molecular Modelling Arbeiten.

Auffällig ist auch, dass Verbindungen wie **109** und **157** trotz sehr guter Inhibition der PFT keine Apoptose im zellulären Assay auslösten. Bei diesem Assay wurden die zu testenden Substanzen gelöst zu den transformierten Zellen in das Medium gegeben. Vorbedingung zur eine Apoptose-induzierenden Wirkung ist also die Diffusion durch die Plasmamembran. Durch die stark differierenden ClogP Werte wird in den Apoptose Assays eine zusätzliche Variable eingeführt. Fehlende Wirkung kann also nicht nur mit fehlender Affinität zu Target-Enzym erklärt werden, sondern möglicherweise auf eine starke Neigung zum Verbleib in

einer Membran oder das Erreichen unterschiedlicher intrazellulärer Inhibitorkonzentrationen zurückgeführt werden. Ziel der Optimierung muss es daher sein, auch diesen Parameter konstant im gewünschten Bereich zu halten, um die Ergebnisse zukünftiger Apoptose-Assays sicherer analysieren zu können.

4.3.4.6 Steigerung der Zahl und Stärke der Wasserstoffbrücken (unter Beachtung der Lipinski/Kopple Regeln)

Die Werte in Tabelle 13 fassen die genannten Parameter für die bereits getesteten Verbindungen und die Optimierungsvorschläge zusammen. Für Letztere liegen die Zahl der Wasserstoffbrücken ebenso innerhalb der von Lipinski und Kopple determinierten Limits, wie die Zahl potentieller Wasserstoffbrückendonoren und Akzeptoren. Ebenfalls aus Tabelle 13 zu ersehen ist die Verbesserung der CLogP Werte der Optimierungsvorschläge.

	Drehbare Bindungen	**IC50**	**CLogP**	**HB Donoren/ Akzeptoren /Summe**
CAAX kompetitive Inhibitoren				
112	21	11	4,917	5 , 6 , 11
115	16	13	2,534	5 , 7 , 12
FPP kompetitive Inhibitoren				
114	20	5	5,437	3 , 8 , 11
110	22	9	7,329	3 , 8 , 11
129	19	16	5,642	3 , 7 , 10
130	20	>100	5,205	3 , 7 , 10
Bisubstrat-inhibitoren				
109	18	6	3,843	6 , 6 , 12
156	18	5	3,843	6 , 6 , 12
124	19	16	6,872	3 , 7 , 10
159	18	23	3,843	6 , 6 , 12
9	27	40	7,477	5 , 9 , 14
Optimierte Inhibitoren				
160	10		4,904	3 , 9 , 12
161	11		4,861	6 , 5 , 11
161	10		4,635	3 , 9 , 12

Tabelle 13: ClogP Werte, Wasserstoffbrückendonoren und –akzeptoren und Anzahl drehbarer Bindungen der interessantesten Inhibitoren.

4.3.4.7 Verstärkung der Bindung von Histidin an Zn^{2+}

Die N-Methylierung des Imidazols bewirkt eine Verstärkung der Wechselwirkung mit dem Zinkion, vermutlich über eine stärkere Ladungskompensation.[157] Gleichzeitig ist die Alkylierung auch als Mittel zur Steigerung der Membranpenetrationsfähigkeit und der

Bioverfügbarkeit bereits verwendet worden.[63] Aus den in Abbschnitt 4.3.3 gezeigten Bindungsmodi geht hervor, dass eine Alkylierung des Histidines ohne sterische Komplikationen möglich sein sollte. Die in den Pepticinnamin E Analoga der ersten Generation gefundenen günstigen Bindungsabstände des Imidazolringes zum Zinkion konnten in den vorgeschlagenen Inhibitoren der zweiten Generation erhalten werden. Die N-Methylierung und der damit verbundene verstärkte Ladungstransfer dürften diese Wechselwirkung verbessern. Eine kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur eines PFT-Inhibitor Komplexes bestätigt den Vorschlag zur Verwendung zyklischer Verbindungen und alkylierter Imidazole.[177]

4.3.5 Verbesserte Selektivität: Vergleich PFT, GGTase I, GGTase II

Eines der Ziele dieses Kooperationsprojektes war die Entwicklung von molekularen Werkzeugen zur Analyse von Signaltransduktionsprozessen. Wie in Kapitel 2 erwähnt, kann die Übertragung eines Geranylgeranyl-Restes auf K-Ras durch die GGTase I die Wirkung einer Inhibition der PFT kompensieren. Natürliches Substrat der GGTase I ist unter anderem das Protein Rho. Einige der hier untersuchten Verbindungen inhibieren sowohl die PFT als auch die GGTase I.[169] Sie sind als Werkzeuge im oben genannten Sinne daher nur eingeschränkt brauchbar, da die Ergebnisse eines Zelltests unweigerlich verfälscht würden. Die Existenz der strukturell verwandten GGTase II, die für Geranylgeranylierung von Rab-Proteinen verantwortlich ist, wirkt sich in diesen Sinne auch negativ auf die Aussagekraft von *in vivo* Testresultaten aus. Im Anschluss an eine Validierung der Aktivität der hier vorgeschlagenen Verbindungen, wäre daher eine Verbesserung der Selektivität innerhalb der Gruppe der Prenyltransferasen erforderlich.

4.3.5.1 Vergleich von PFT, GGTase I und GGTase II

Für das Design selektiver Inhibitoren ist ein Vergleich der Strukturen der GGTase I, GGTase II und der PFT hilfreich. Für GGTase II und PFT liegen Kristallstrukturen vor, für die GGTase I jedoch nicht. Die α-Untereinheit der GGTase I ist mit dem der PFT identisch. Natürliche Selektivitäten und regulatorische Vorgänge sind daher primär mit den Unterschieden in der β-Untereinheit assoziiert. Für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurde ein Homologiemodell der β-Untereinheit der GGTase I erstellt. Der Grad der Identität zwischen der PFT und der GGTase I ist mit etwa 30% deutlich niedriger als bei den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die in Kapitel 4.2 beschrieben wurden. Dennoch konnte hier ein erstes Modell erstellt werden, das zumindest im unmittelbaren Bereich des aktiven Zentrums aufgrund der dort recht hohen Sequenzidentität eine akzeptable Genauigkeit aufweisen dürfte. Für das Modell wurde folgendes Alignment zugrundegelegt, das zum Vergleich auch die Sequenz der GGTase II enthält:

```
PFT         PVWSEPLYSLRPEHARERLQDDSVETVTSIEQAKVEEKIQEVFSSYKFNHLVPRLVLQRE
GGTaseI     MCQA-----TNGPSRVVT-----------------------------------------K
GGTaseII    TQQKDVTIKSDAPDTLLL-----------------------------------------E

PFT         KHFHYLKRGLRQLTDAYECLDASRPWLCYWILHSLELLDEPIPQIVAT------------
GGTaseI     KHRKFFERHLQLLPSSHQGHDVNRMAIIFYSISGLSIFDVNVSAKYGDHLGWMRKHYIKT
GGTaseII    KHADYIASYGSKKD----------------------------------------------

PFT         ------------------------------------------------------------
GGTaseI     VLDDTENTVISGFVGSLVMNIPHATTINLPNTLFALLSMIMLRDYEYFETI---------
GGTaseII    -------------------------------------------DYEYCMSEYLRMSGVYW

PFT         -----------------DVCQFLELCQSPDGGFGGGPGQYPHLAPT----------YAAV
GGTaseI     -------------LDKRSLARFVSKCQRPDRGSFVSCLDYKTNCGSSVDSDDLRFCYIAV
GGTaseII    GLTVMDLMGQLHRMNKEEILVFIKSCQHECGGVSASIGHDPHLLYT----------LSAV

PFT         NALCIIGT---EEAYNVINREKLLQYLYSLKQPDGSFLMHVGGEVDVRSAYCAASVASLT
GGTaseI     AILYICGCRSKEDFDEYIDTEKLLGYIMSQQCYNGAFGAH--------------------
GGTaseII    QILTLY------DSIHVINVDKVVAYVQSLQKEDGSFAGDIWGEIDTRFSFCAVATLALL

PFT         NIITPDLFEGTAEWIARCQNWEGGIGGVPGMEAHGGYTFCGLAALVILKKERSLNLKSL-
GGTaseI     ------------------------------NEPHSGYTSCALSTLALLSSLEKLSDKFKE
GGTaseII    GKLDAINVEKAIEFVLSCMNFDGGFGCRPGSESHAGQIYCCTGFLAITSQLHQVNSD-L-

PFT         --LQWVTSRQMRF------------------EGGFQGRCNKLVDGCYSFWQAGLLPLLHR
GGTaseI     DTITWLLHRQVSSHGCMKFESELNASYDQSDDGGFQGRENKFADTCYAFWCLNSLHLLTK
GGTaseII    --LGWWLCERQLP------------------SGGLNGRPEKLPDVCYSWWVLASLKIIGR

PFT         ALHAQGDPALSMSHWMFHQQALQEYILMCCQCPAGGLLDKPGKSRDFYHTCYCLSGLSIA
GGTaseI     DWKMLCQTELVTNYLLDRT----------QKTLTGGFSKNDEEDADLYHSCLGSAALALI
GGTaseII    L------------HWIDR-EKLRSFILACQDEETGGFADRPGDMVDPFHTLFGIAGLSLL

PFT                   QHFGSGAMLHDVVMGVPENVLQPTHPVYNIGPDKVIQATTHFLQKPVPGF
GGTaseI               EGKFNGEL------CIPQEIFNDFSKRCCF--------------------
GGTaseII              GEEQIKPVSP--VFCMPEEVLQRVNVQPELVS--------------
```

Abbildung 75: Alignment der Sequenzen der β-Untereinheiten der PFT, GGTaseI und GGTaseII (RabGGTase), identische Rest sind grau hinterlegt, homologe Reste in grün.

Aus diesem Alignment wurde analog zu der für die Homologiemodelle der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen beschriebenen Vorgehensweise mit den Programmen MODELLER und WHATCHECK ein Homologiemodell der β-Untereinheit der GGTase I erstellt. Zusammen mit dem bekannten α-Untereinheit der PFT ergab dies ein Modell der GGTase I.

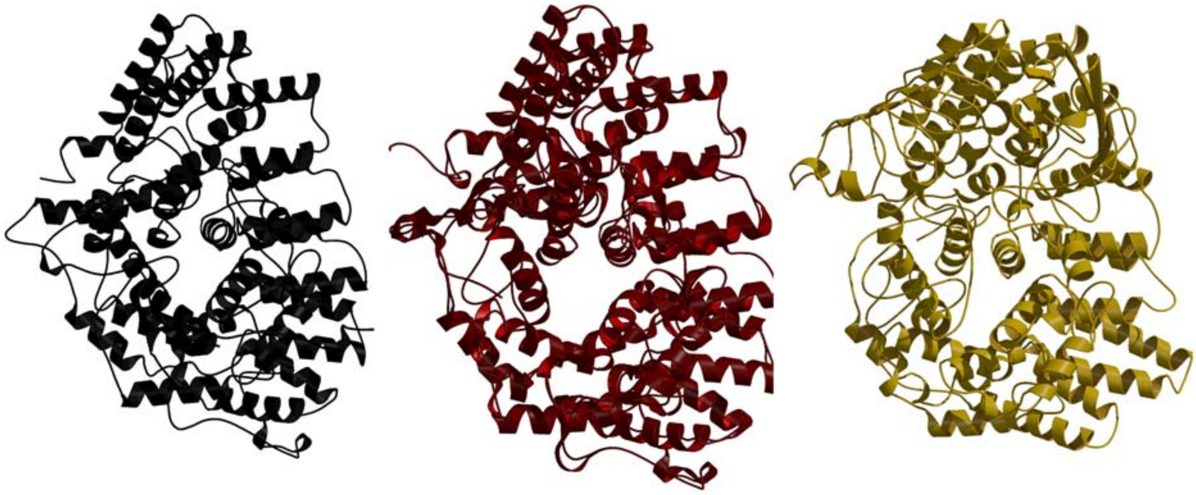


Abbildung 76: Vergleich der Strukturen der PFT (schwarz), GGTase II (rot), GGTase I (gold, Homologiemodell).

Überlagert man die in Abbildung 76 gezeigten Strukturen der GGTase II, der PFT und des Modells der GGTase I lassen sich folgende Unterschiede erkennen: Ala151β und Pro152β der PFT bilden einen Teil der Bindungstasche für die Methioninseitenkette der CVIM Sequenz (K-Ras) bzw. die Serinseitenkette der CVLS Sequenz (H-Ras). In der GGTase I ist Pro152β durch Arg133β ersetzt. Dies und der Ersatz von Met193β in der PFT durch Tyr169β in der GGTase I lassen vermuten, dass hier die C-terminale Aminosäure in einer anderen Konformation bindet und dadurch das freie Carboxylat andere Wasserstoffbrücken ausbildet. In diesem Bereich findet man in der GGTase II Leu96β und Tyr97β, die keinen Platz für eine Methionin- oder Serinseitenkette lassen. Gln167α in PFT bildet mit dem freien Carboxylat der C-terminalen Aminosäure ein Wasserstoffbrücke. An dieser Stelle findet man in der GGTase II Gly108α. Der Bereich der Carboxylat-Bindungstasche in der PFT und GGTase I ist daher im Bezug auf das Design selektiver Inhibitoren für eines der untersuchten Enzyme von großem Interesse.

Auch in der Prenylbindungstasche gibt es Unterschiede, die für das Design selektiver Inhibitoren ausgenutzt werden könnten. Die Prenylbindungstasche in der GGTase II β Untereinheit wird von sieben hydrophoben Aminosäuren begrenzt: Trp52β, Phe147β, Tyr195β, Trp243β, Trp244β, Phe289β und Phe293β. Ähnliche Reste finden sich in der PFT und der GGTase Die Unterschiede sind in Tabelle 14 zusammengestellt.

Nr.	PFT	GGTase I	GGTase II
1	Tyr 105 β	Ser 85 β	Tyr 603 β
2	Ala 151 β	Ala 132 β	Leu 648 β
3	Ser 99 β	Thr 79 β	Leu 597 β
4	Trp 102 β	Thr 82 β	Ser 600 β
5	Trp 106 β	Gly 86 β	Trp 604 β
6	Tyr 205 β	Val 135 β	Ser 516 β

Tabelle 14: Unterschiede in den Prenylbindungstasche der GGTase I, GGTase II und PFT.

Der Länge des Geranylgeranylrestes erfordert die Substitution von Trp 102 β und Trp 106 β in der PFT durch kleinere Reste in den Geranylgeranyltransferasen (Zeilen 4 und 5). Hierdurch ist die Prenylbindungstasche tiefer. Dies kann für das Design von Inhibitoren ausgenutzt werden, die zwischen GGTase I und II einerseits und PFT andererseits differenzieren könnten. Eine Differenzierung zugunsten der PFT wäre hingegen nur möglich, wenn z.B. die Substitution des Ala 151 β in der PFT gegen das Leu 648 β der GGTase II ausgenutzt würde. Zwischen Prenylbindungstasche und Carboxylatbindungstasche finden sich bei der PFT und GGTase II ein Arginin. In der GGTase I wird diese Position durch ein Cystein besetzt, so dass auch dieser Bereich zur Verbesserung der Selektivität von Inhibitoren verwendet werden kann. Die Pyrophosphatbindungstasche hingegen ist in allen Enzymen nahezu identisch. Dieser Bereich kann daher nur als Quelle von Affinität, nicht aber von Selektivität dienen. Daraus könnten folgende Eigenschaftsprofile für selektive Inhibitoren abgeleitet werden:

PFT:

Eine sehr polare Gruppe oder ein freies Carboxylat für die Bindung in der Carboxylat-Bindungstasche der PFT, gepaart mit einem kleineren hydrophoben Rest zur Bindung in der Farnesyl-Bindungstasche sollten sich günstig auf die Inhibition der PFT und ungünstig auf die Inhibition der GGTase I und II auswirken.

GGTase I:

Eine weniger polare Gruppe und ein freies Carboxylat für die Bindung in der Carboxylat-Bindungstasche alleine würden zwar aufgrund der identischen α-Untereinheit keine Differenzierung zwischen PFT und GGTase I erlauben, die GGTase II sollte bereits durch dieses Strukturelement ausgeschlossen sein. Für die Differenzierung zwischen GGTase I und der PFT könnte ein entsprechend großer sterische Anspruch des hydrophoben Restes sorgen.

GGTase II:

Das Fehlen einer Gruppe die in die Carboxylat- indungstasche passt, sollte die Affinität zur GGTase I und PFT senken. Durch ein Ausnutzen der Unterschiede im hinteren Teil der Prenylbindungstasche (Zeilen 4 und 5) könnte die Selektivität zugunsten der GGTase II beeinflusst werden.

4.3.5.2 Strukturvorschläge

Auf Basis dieser Analyse könnten die bereits gezeigten Strukturen für optimierte Inhibitoren zu Selektivitätssteigerung verändert werden.

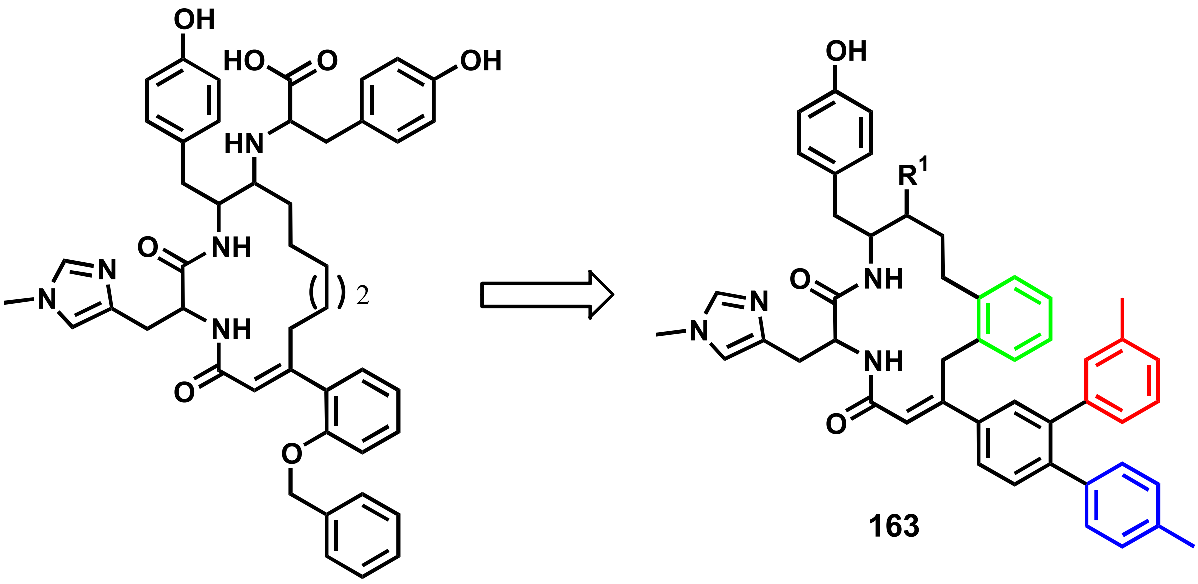


Abbildung 77: Modifikation eines PFT selektiven Inhibitors.

Die Einführung des blau markierten Phenylrestes in **163** würde die Bindung an die GGTase I und bedingt an die GGTase II begünstigen, (Zeile 6) da das Tyr 205 β der PFT hier stören würde. Der rot markierte Phenylrest könnte die Selektivität ebenfalls zugunsten der GGTase I beeinflussen, da (Zeile 5) die beiden Tryptophan Reste in der PFT und der GGTase II hier mehr Platz beanspruchen als das Glycin in der GGTase I. Der grün markierte Phenylrest schließlich würde mit den Argininresten der PFT und der GGTase II in Konflikt geraten, nicht aber mit dem Cystein der GGTase I. Eine Selektivität ausschließlich zugunsten der GGTase II wäre am Besten über die Variation des Restes R^1 zu erreichen. Ein sehr hydrophober Rest würde weniger gut für eine Bindung in der Carboxylatbindungstasche der GGTase I oder der PFT geeignet sein.

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Ziel des ersten Projektes der vorliegenden Arbeit war es, durch die Verwendung von Methoden der kombinatorischen Chemie, ergänzt durch Molecular Modelling Arbeiten, eine Leitstruktur für Moleküle zu entwickeln, die, durch Beschleunigung der GTPase Reaktion (GTP $\rightarrow$ GDP + P, die sogenannte „Switch-Off“ Reaktion) von Mutanten des Ras-Proteins, die gestörte Wechselwirkung mit dem *GTPase activating protein* GAP kompensieren. Ein solches GAP ersetzendes kleines Molekül muss einerseits die Bindung im Bereich der GTP Tasche an Ras fördern und andererseits die GTP Hydrolyse beschleunigen.

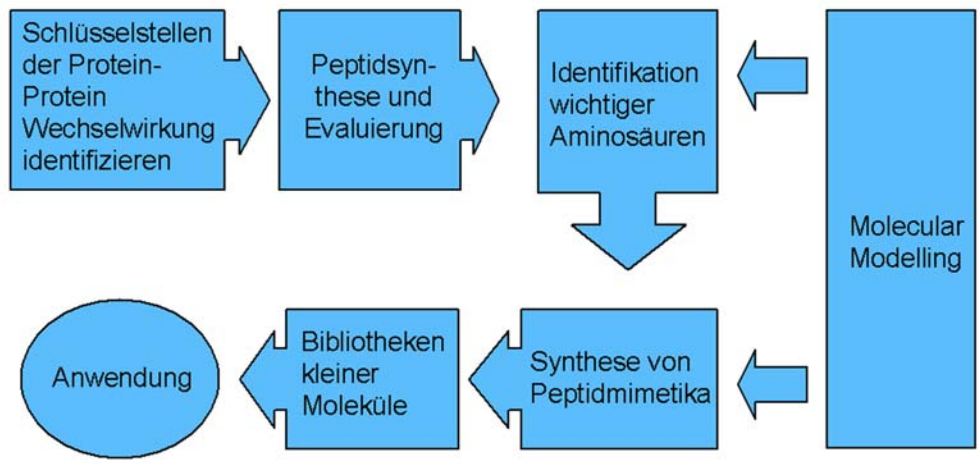


Abbildung 78: Strategie zur Entwicklung und Optimierung einer Leitstruktur wenn ein Rückgriff auf einen bereits validierten Startpunkt nicht möglich ist.[63,95]

Gemäß der in Abbildung 78 gezeigte Strategie, sollten durch die Synthese und Evaluierung von Peptiden Schlüsselstellen der Interaktion zwischen Ras und einem niedermolekularen Effektor identifiziert werden. Unterstützt durch Molecular Modelling sollten diese Resultate rationalisiert und zum Design von Peptidmimetika herangezogen werden. Basierend auf einem *in silico screening* einer kombinatorischen Peptidbibliothek von 40^4 (2,560,000 Verbindungen) wurde zunächst eine fokussierte Bibliothek von 36 Tetrapeptiden synthetisiert und mit den in Abbildung 79 gezeigten Hydrolyse-fördernden Kopfgruppen verknüpft.

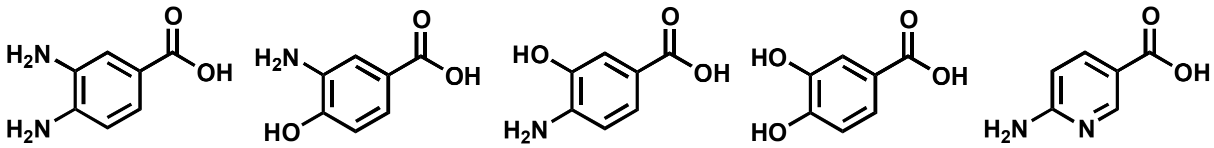


Abbildung 79: Kopfgruppen für die Peptidbibliothek, die die Hydrolyse von GTP beschleunigen sollten.

Da bei der biologischen Evaluierung jedoch keine Hydrolyse von GTP gemessen werden konnte, wurde eine kombinatorische Split-Mix-Biblithek von ca. 32,000 Peptiden synthetisiert, die anschließend in einem neu zu entwickelnden On-Bead Assay evaluiert werden sollte. Um die Bindung der Peptide an Ras im Bereich der GTP Bindungstasche zu

gewährleisten, wurden diese Peptide kovalent über einen Spacer mit GTP verknüpft. Aufgrund seiner hohen Affinität zu Ras (K_d = 10^{-11}M) verankert GTP die Verbindungen sicher im gewünschten Bereich.

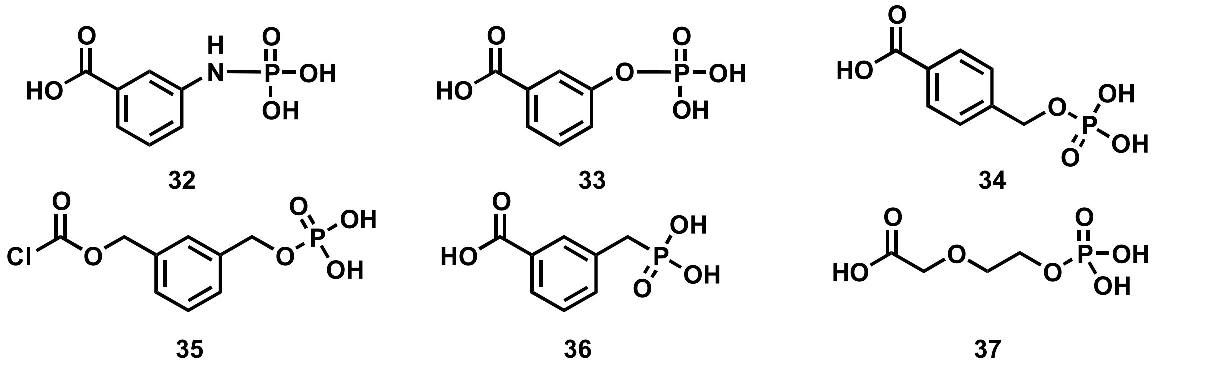


Abbildung 80: Strukturen der synthetisierten und getesteten Spacer

Die Spacer sollten als Platzhalter für später einzuführende Hydrolyse-fördernde Gruppen dienen. Es wurden verschiedene Spacer entwickelt und synthetisiert (siehe Abbildung 80). Daneben wurde auch die Methode der Synthese von GTP-Konjugaten verbessert und für die Festphasensynthese angepasst. Anstelle GTP mit den Peptiden EDC-vermittelt zu verknüpfen, wird GDP hierbei mit CDI voraktiviert und ergibt nach Umsetzung mit substituierten Monophosphaten das gewünschte GTP-Konjugat in hohen Ausbeuten.

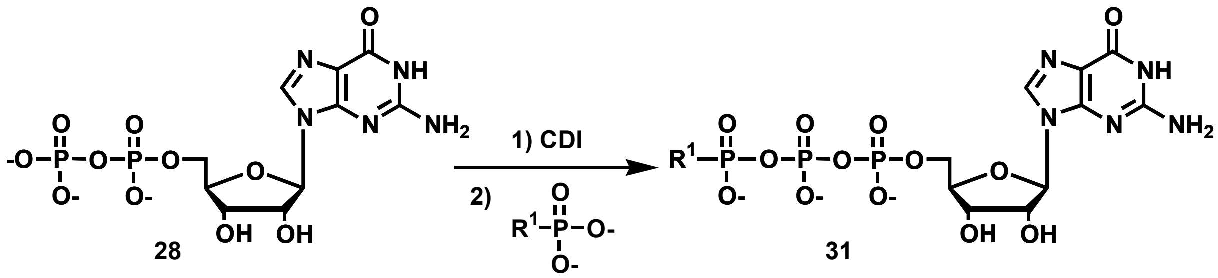


Abbildung 81: Neue Synthese von GTP-Analoga

Vor der Synthese der Split-Mix-Bibliothek wurden verschiedene GTP-Peptid-Konjugate einzeln synthetisiert um die allgemeine Anwendbarkeit der Synthesemethoden zu validieren. Um eine milde Abspaltung der GTP-Peptid-Konjugate vom Harz zu ermöglichen, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. L. Soulere ein Pd(0) labiler Linker synthetisiert. Die auf diese Weise getesteten Methoden und Reagentien wurden zur Synthese der Split-Mix-Bibliotheken verwendet, wobei die Verfahren soweit standardisiert werden konnten, dass die Synthesen auch auf einem Synthese-Halbautomaten (Quest 210 ®) durchgeführt werden können. Als polymerer Träger wurde nach Evaluierung verschiedener Möglichkeiten das von M. Meldal et al. entwickelte PEGA Harz ausgewählt,[129,178] da es für Proteine wie Ras (21 kDa) ausreichend permeabel ist und über ein ausgezeichnetes Quellverhalten in Wasser bzw. wässrigen Puffersystemen verfügt.

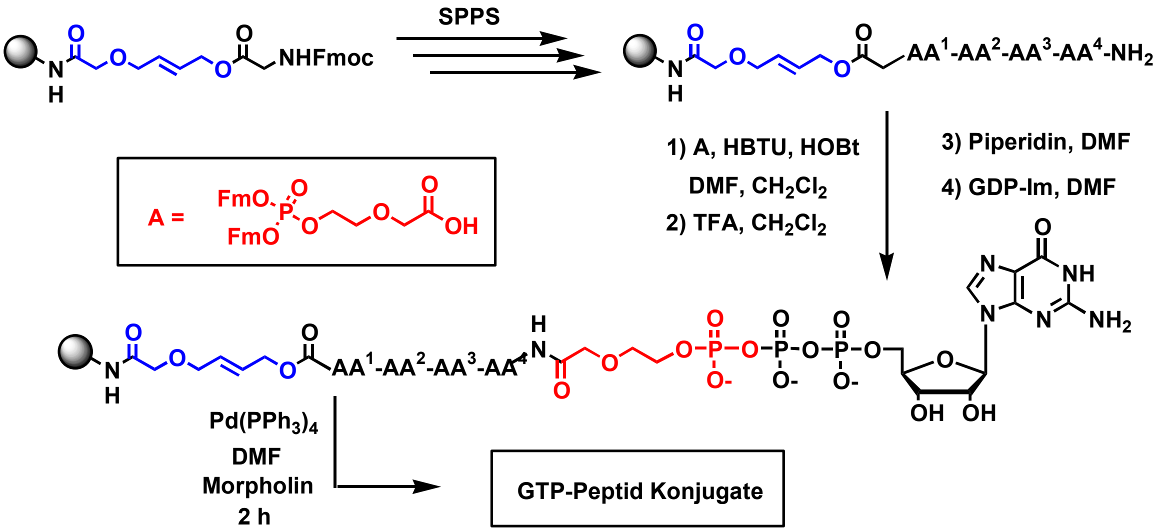


Abbildung 82: Synthese von GTP-Peptidkonjugaten mit einen Pd(0) labilen Linker (blau markiert) und dem Spacer 37 (rot markiert)

Nach der Synthese wurden die GTP-Peptid beladenen PEGA-Beads mit fluoreszenzmarkiertem H-Ras inkubiert. Unter den gewählten Bedingungen konnten nur solche GTP-Peptid Konjugate das Protein binden, die über eine hohe Affinität zu Ras verfügen. Weniger als 1 ‰ der Beads (ca 30 von 32,000 Peptiden) zeigten eine Affinität zu Ras. Die fluoreszierenden Beads wurden manuell unter dem Mikroskop selektiert und durch Edman-Abbau sequenziert.

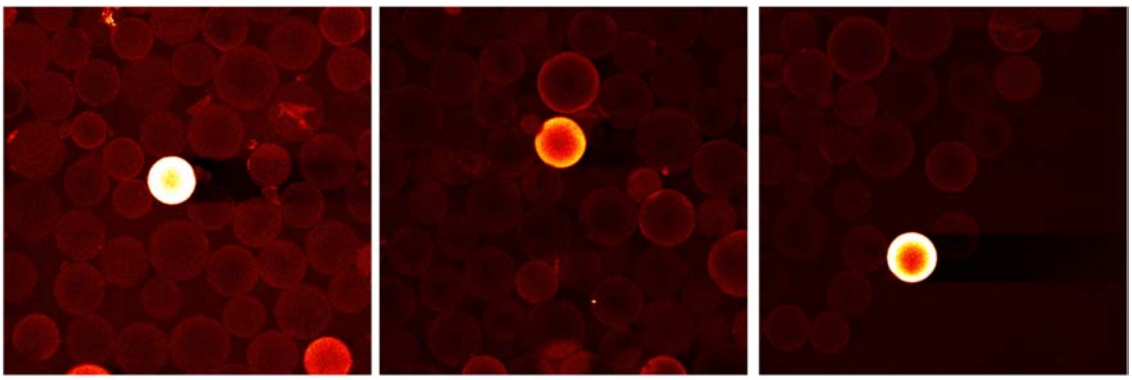


Abbildung 83: Bilder der Split-Mix-Bibliothek. Die fluoreszierenden Beads heben sich deutlich vom Rest ab, der kein Atto655*Ras gebunden hat.

Die bei der BASF AG durchgeführte Edman Sequenzierung der manuell selektierten, fluoreszierenden Beads ergab folgende Sequenzen: GAMGA, YMMLL, GAPME, PGPMG, MPFEM und MPPAE. Offenbar besteht eine Bevorzugung für Prolin oder Methionin in der Position 3. Diese Resultate konnten im Anschluss durch Docking Experimente rationalisiert werden. Die Seitenketten von Methionin und Prolin binden demnach in einer hydrophoben Stelle auf der Ras-Oberfläche. Die Peptide weisen eine Turn-Konformation auf. Auf Basis der gefundenen Bindungsmodi wurde daher das in Abbildung 84 gezeigte Peptidmimetikum als

erste Leitstruktur entwickelt, die als Grundlage für die weitere Entwicklung eines GAP-ersetzenden Moleküls dienen kann.

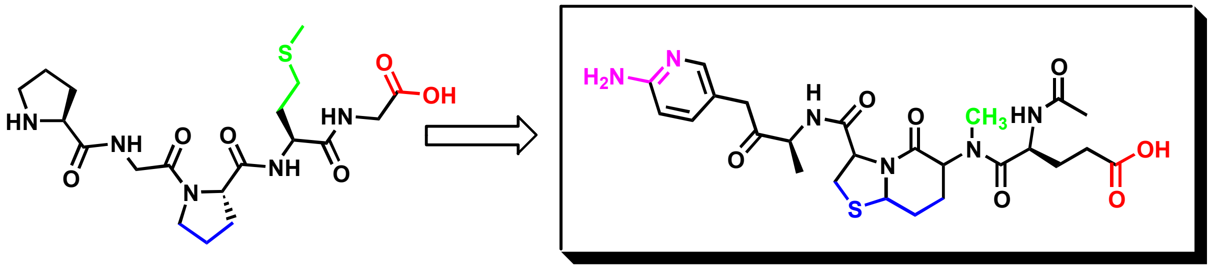
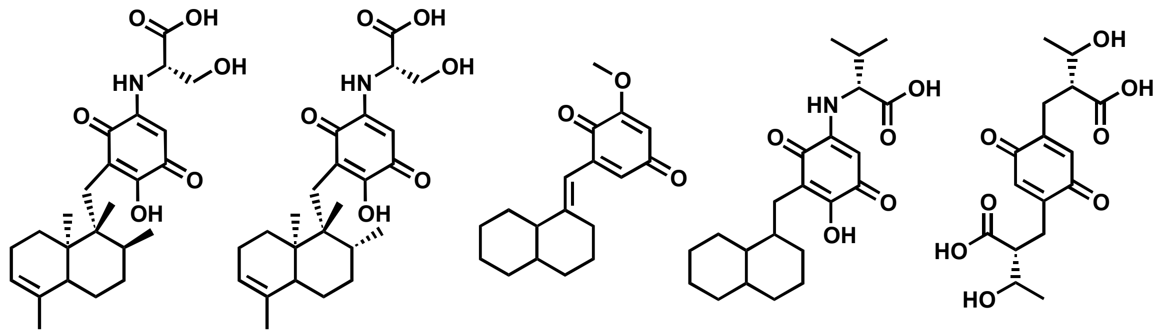


Abbildung 84: Aus den Peptidsequenzen (hier PGPMG gezeigt) konnten Rückschlüsse auf wichtige Wechselwirkungen gezogen und ein Peptidmimetikum als neue Leitstruktur durch Molecular Modelling entworfen werden.

In weiteren Projekten der vorliegenden Arbeit sollten die Aktivitäten und Selektivitäten von Inhibitoren verschiedener Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sowie der Protein-Farnesyl-Transferase durch Molecular Modelling Studien rationalisiert und zur Entwicklung optimierter Inhibitoren herangezogen werden. Um das Verständnis für die Wirkung und die Selektivität des Naturstoffs Nakijichinon C **6** und dessen Analoga auf Rezeptor-Tyrosin-Kinasen auf molekularer Ebene zu erweitern, sollte aufgeklärt werden, wie die in Abbildung 85 gezeigten Verbindungen mit den Kinasedomänen der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Tie-2, VEGFR-2, VEGFR-3 und erbB-2 und IGF1R wechselwirken. Aus den Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sollten Vorhersagen für verbesserte Inhibitoren abgeleitet werden.



6 **98** **99** **100** **101**

Abbildung 85: Strukturen von Nakijichinon (6) und den hier untersuchten, biologisch aktiven Analoga

Für die Analyse mittels Molecular Modelling sind dreidimensionale Strukturen der Inhibitoren und Protein erforderlich. Die Strukturen der Inhibitoren wurden durch Kraftfeldrechnungen mit dem Programm CHARMM bestimmt. Da nicht für alle Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Kristallstrukturen vorlagen, wurden Homologiemodelle der Kinasedomänen mit dem Programm MODELLER und manueller Optimierung erstellt. Da Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sehr flexibel sind und bei der Bindung von Liganden ausgeprägt Konformationsänderungen durchlaufen, wurden Modelle verschiedener Konformation erstellt und zur Analyse der Bindungsmodi der Nakijichinon-Analoga herangezogen.

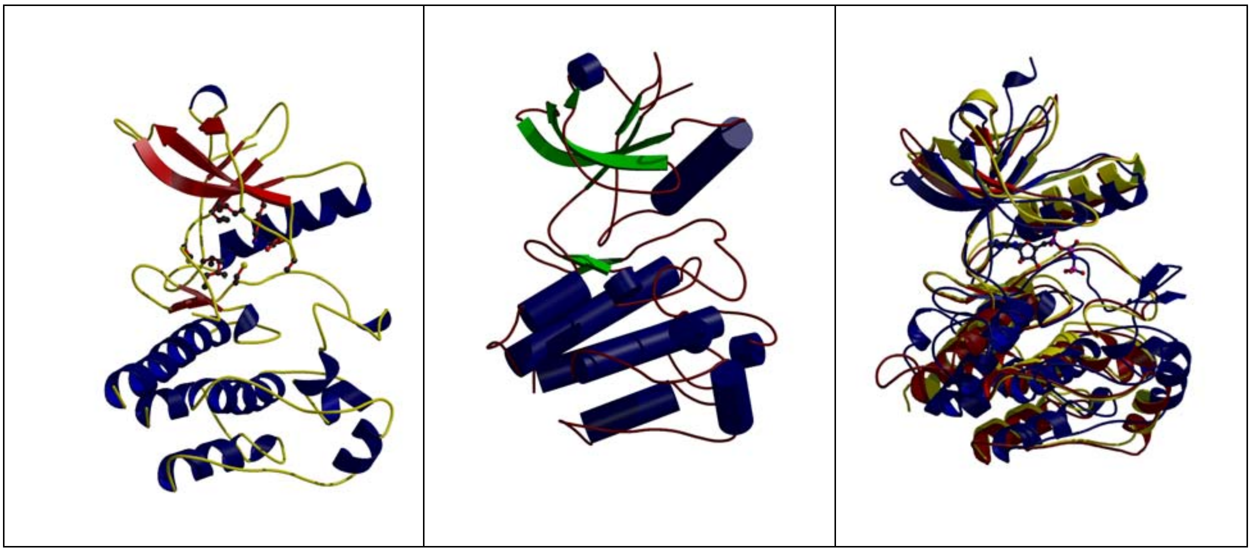


Abbildung 86: a) Ribbon-Diagramm eines der Homologiemodelle der Kinasedomäne von VEGFR-2, b) Ribbon-Diagramm der Kinasedomäne (Homologiemodell) von VEGFR-3, c) Überlagerung der Kinasendomänen von IGF1R (blau), VEGFR-2 (rot) und Tie-2 (gelb). Diese und ähnliche Überlagerungen dienten zur Analyse der molekularen Ursachen der Selektivitäten. Weitere Strukturen sind in Anhang IV gezeigt.

Stellvertretend für die fünf untersuchten Verbindungen ist in Abbildung die Wechselwirkung des Naturstoffes Nakijichinon C **6** mit der Kinase ErbB-2 schematisch dargestellt. Als ATP-kompetitive Inhibitoren bilden Nakijichinon und die untersuchten Analoga essentielle Wasserstoffbrücken zur sogenannten *Hinge Region* der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aus, wie sie auch vom Purin des ATP gebildet werden. Die Aminosäuresubstituenten imitieren die Wechselwirkungen zwischen der Ribose des ATP und der Kinase.

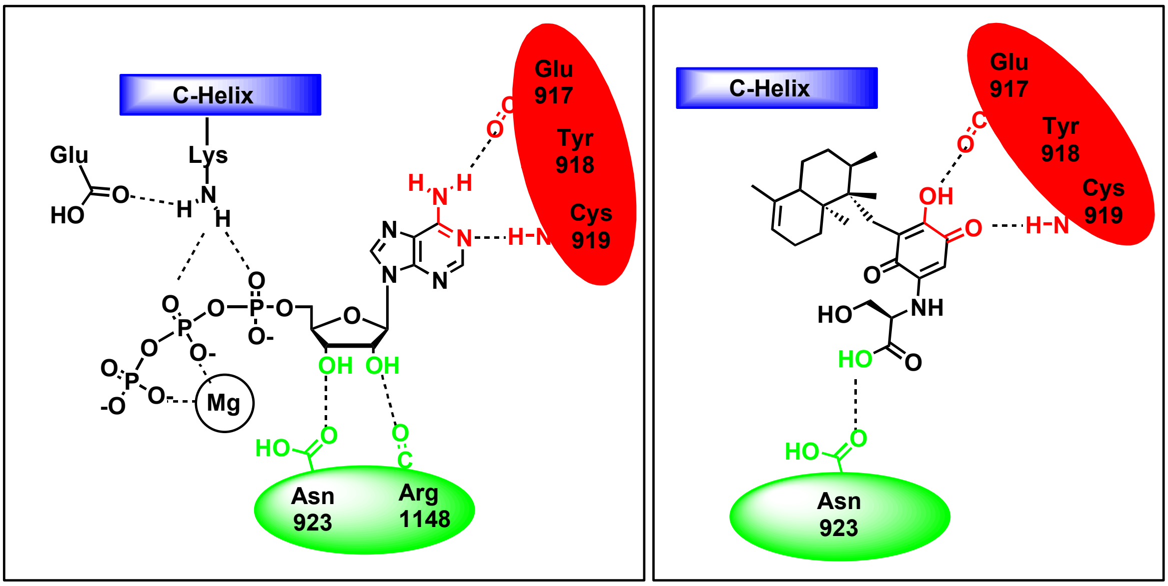


Abbildung 87: Nakijichinon C und die biologisch aktiven Analoga könnten ähnlich an die Rezeptor Tyrosin Kinasen binden wie ATP. Die Hinge Region ist rot dargestellt.

Aus dem in dieser Arbeit aufgeklärten Bindungsmodus folgt auch die Ursache für die Selektivität. Das hydrophobe Dekalingerüst der Nakijichinon-Analoga bindet in einer

hydrophoben Tasche der Rezeptor-Tyrosin-Kinase. Viele Reste innerhalb der Kinasedomänen verschiedener Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sind hoch konserviert. Diese hydrophobe Tasche ist jedoch eine sehr variable Region. Zahlreiche Substitutionen verändern die Form und Größe der hydrophoben Taschen. Dem entsprechend ist die Größe und Form des hydrophoben Dekalingerüstes ausschlaggebend für die Fähigkeit einer Verbindung eine bestimmte Kinase zu inhibieren. Für alle in Abbildung 85 gezeigten Verbindungen konnten die molekularen Ursachen der Selektivität auf Basis dieses Bindungsmodells aufgeklärt werden. Exemplarisch ist in Abbildung 88 die Bindung von Verbindung **98** in der VEGFR-2 Kinasedomäne gezeigt. Hervor zu heben ist der abweichende Bindungsmodus von Verbindung **101**, die in der Triphosphatbindungstasche der Kinasen bindet und damit eine Leitstruktur für eine neue Klasse von Kinaseinhibitoren sein könnte.

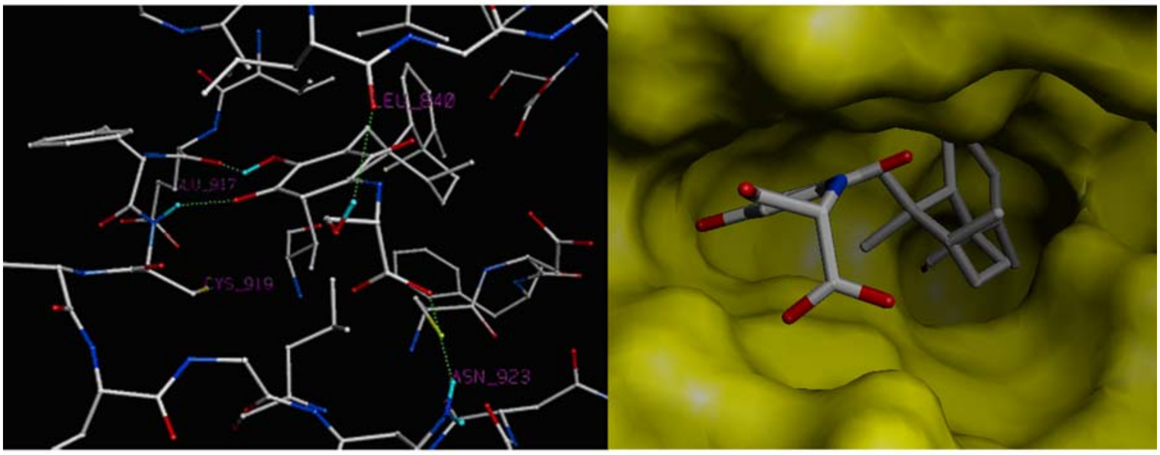
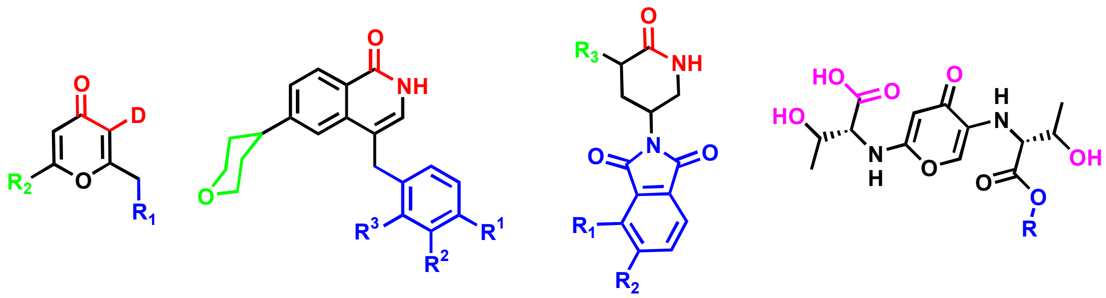


Abbildung 88: Verbindung 98 im aktiven Zentrum der VEGFR-2 Kinase Domäne

Auf Basis des entwickelten Bindungsmodells wurden Vorschläge für optimierte Kinaseinhibitoren erarbeitet. Hierbei wurde die für in vivo Experimente problematische Chinon-Einheit bioisoster ersetzt.



103 105 106 108

Abbildung 89: Strukturvorschläge für optimierte Kinaseinhibitoren. Grün markierte Reste sollten die Wechselwirkungen die ATP-Ribose imitieren, blau markierte Reste könnten in der hydrophoben Tasche binden und zur Steuerung der Selektivität herangezogen werden. Rot markierte Atome sind für die Wechselwirkung mit der Hinge Region essentiell. Die magente markierten Atome sichern die Bindung in der Triphosphatbindungstasche.

Für die Molecular Modelling Analyse der Verbindungen einer Bibliothek von Pepticinnamin E Analoga, die von Dr. M. Thutewohl synthetisiert wurde, konnte auf zahlreiche Kristall-strukturen des Zielenzyms, der Farnesyltransferase, zurückgegriffen werden. Die Strukturen

der zu untersuchenden Verbindungen (siehe Anhang X) wurden mit CHARMM berechnet und die Inhibitoren anschließend manuell in das aktive Zentrum der Farnesyltransferase gedockt. Die hierbei als vorteilhaft bewerteten Bindungsmodi (siehe Abbildung 90) stehen in vollem Einklang mit den im Anschluss von Dr. M. Thutewohl durchgeführten kinetischen Studien.

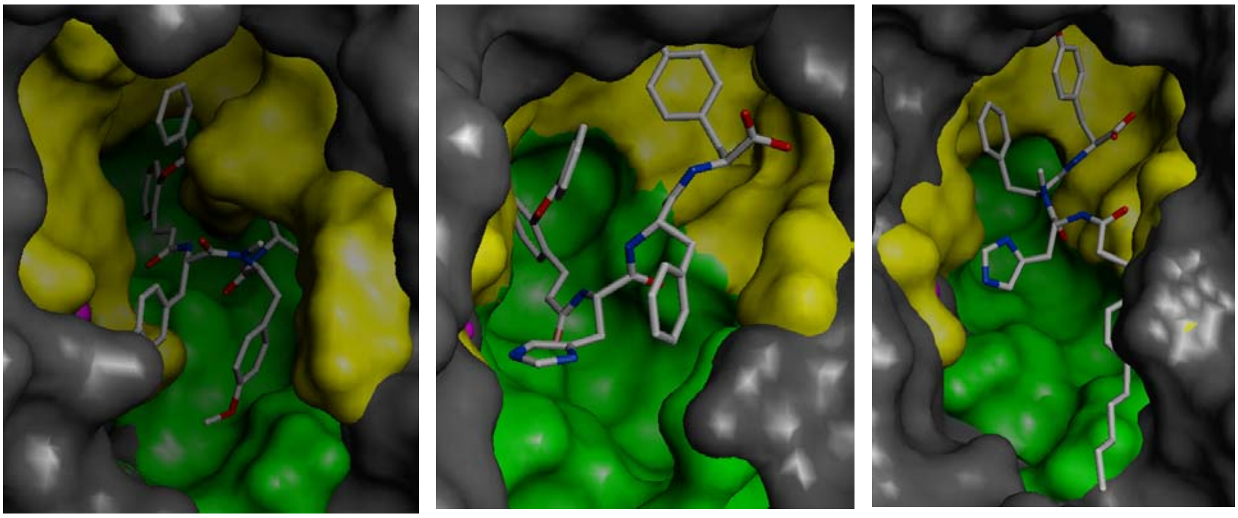
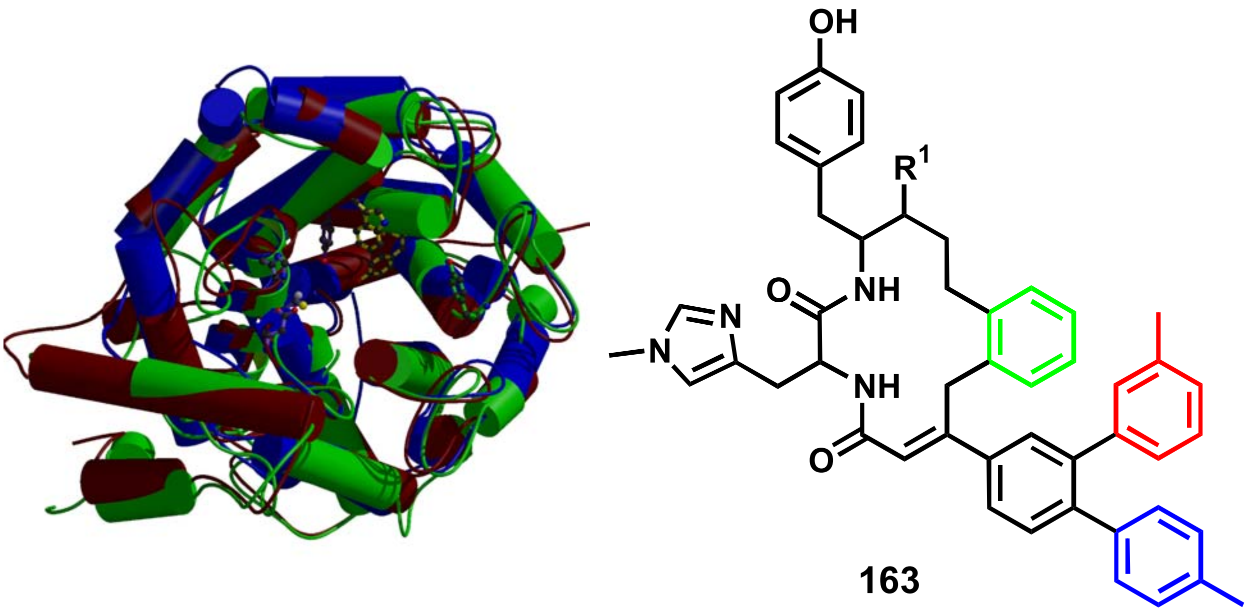


Abbildung 90: Vorgeschlagene Bindungsmodi ausgewählter Verbindungen aus der Bibliothek von Pepticinnamin E Analoga.

Einige der Inhibitoren aus der Bibliothek binden demnach kompetitiv zum Substratpeptid des Enzyms oder kompetitiv zum zweiten Substrat, dem Farnesylpyrophosphat. Den Vorhersagen des Modelling entsprechend, finden sich in der Bibliothek auch Bisubstratinhibitoren, die sowohl kompetitiv zum Substratpeptid als auch kompetitiv zu Farnesylpyrophosphat wirken. Gemäß der im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärten Bindungsmodi ist für die Bindung der Inhibitoren eine starke Wechselwirkung mit dem Zinkion, entweder durch Histidin oder ein Tyrosin vermittelt, essentiell. Neben der Rationalisierung der Aktivitätsunterschiede sollten auch Pepticinammin E Analoga der zweiten Generation entworfen und hinsichtlich der Aktivität und Selektivität bezüglich der Farnesyltransferase oder der Geranylgeranyl-Transferasen I und II optimiert werden. Hierbei wurden auch die pharmakologischen Eigenschaften der Verbindungen (LogP-Wert, Molekulargewicht) berücksichtigt. Ein solcher Inhibitor der zweiten Generation könnte Verbindung **163** (siehe Abbildung 91b) sein. Durch die N-Methylierung sollte die Wechselwirkung des Imidazols mit dem Zink verstärkt werden. Anstelle der linearen Pepticinnamin E Analoga, sollten die hier vorgeschlagenen, zyklischen Verbindungen über verbesserte pharmakologische Eigenschaften verfügen. Wichtig bei der Entwicklung der optimierten Inhibitoren war das Resultat, dass Substituenten, die in der Farnesylpyrophosphat-Bindungstasche binden, nicht nur über hydrophobe Wechselwirkungen zu Affinität der Inhibitoren beitragen, sondern auch die Möglichkeit zur Steigerung der Selektivität bieten. Da nur von der Farnesyltransferase und der Geranylgeranyl-Transferase II Kristallstrukturen bekannt sind, wurde für den Entwurf von selektiveren Inhibitoren ein Homologiemodell der Geranylgeranyl-Transferase I erstellt. Die Analyse der strukturellen

Unterschiede, insbesondere innerhalb der β-Untereinheit, ergab, dass durch die in Abbildung 91 farbig hervorgehobenen Modifikationen, die Selektivität deutlich zu verbessern wäre. Die Einführung des blau markierten Phenylrestes in **163** würde die Bindung an die GGTase I und bedingt an die GGTase II begünstigen. Der rot markierte Phenylrest könnte die Selektivität ebenfalls zugunsten der GGTase I beeinflussen. Der grün markierte Phenylrest schließlich würde mit den Argininresten der PFT und der GGTase II in Konflikt geraten, nicht aber mit dem Cystein der GGTase I. Eine Selektivität ausschließlich zugunsten der GGTase II wäre am Besten über die Variation des Restes R[1] zu erreichen.

a) b)



163

Abbildung 91: a) Überlagerung der β-Untereinheiten der GGTase I (blau, Homologiemodell), GGTase II (weinrot, Kristallstruktur) und PFT (grün, Kristallstruktur), b) Modifikation eines PFT selektiven Inhibitors.

Die qualitativen Analysen der Bindungsmodi und Erklärungen für die beobachteten Selektivitäten der Nakijichinon- und Pepticinnamin E-Analoga wurden ergänzt durch quantitative Analysen. Hierbei wurden sowohl Wasserstoffbrücken als auch hydrophoben Wechselwirkungen untersucht. Für Erstere kann die Stärke der Wechselwirkung durch Vergleich mit in der Literatur als optimal bewerteten Parametern beurteilt werden. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Verfahren verwendet zwei Ansätze: 1) Basierend auf der Annahme, dass die Bindungstasche eines Enzyms für die Bindung des natürlichen Substrates im Laufe der Evolution optimiert wurde, wird die Wechselwirkung eines Inhibitors mit dem Zielenzym mit der Wechselwirkung zwischen Enzym und seinem natürlichen Substrate verglichen. Das Ausmaß, in dem ein Inhibitor eine Bindungstasche belegt, kann so bewertet werden. Hierzu werden die van-der-Waals Volumina der Verbindungen verglichen. Dieses Verfahren ist in Abbildung 92 graphisch dargestellt. 2) Fehlt ein natürliches Substrat als Referenz, kann, wie hier im Falle der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen durchgeführt, das van-der-Waals Volumen einer hydrophoben Bindungstasche bestimmt werden. Anschließend wird

auch hier das Ausmaß bestimmt, in dem ein Inhibitor diese Tasche ausfüllt. Je größer der ermittelte Wert, desto stärker dürften die unter dem Begriff „hydrophob" zusammengefassten Wechselwirkungen sein. Die stärkere Affinität von Verbindung **101** zu IGF1R im Vergleich zu Tie-2 konnte durch diese Methode sehr gut erklärt werden.

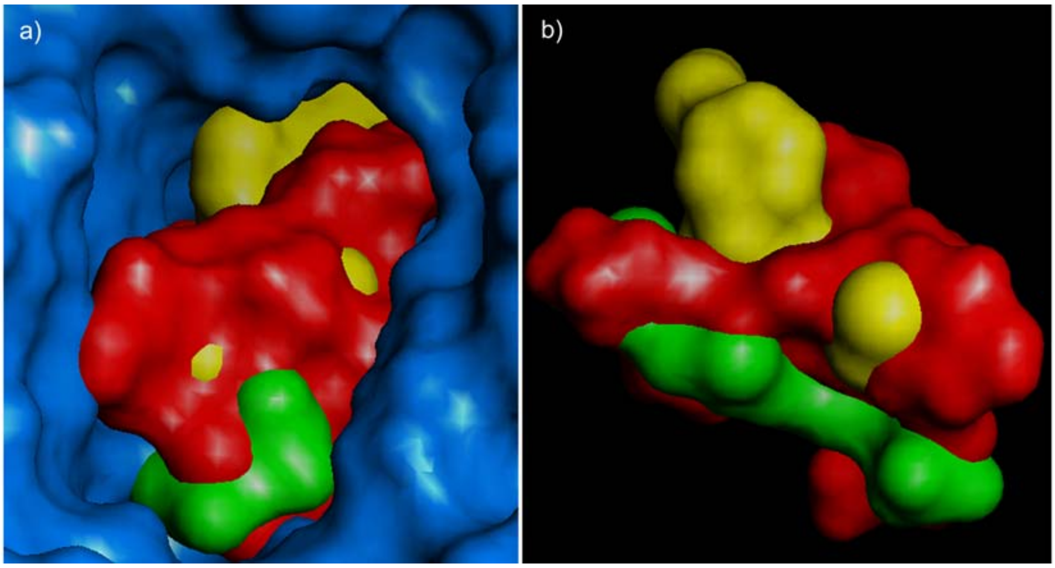


Abbildung 92: a) Pepticinnamin E (rot), CVIM Peptid (gelb) und FPP (grün) im aktiven Zentrum der PFT, b) Seitliche Ansicht, ohne Proteinoberfläche. Pepticinnamin belegt sowohl die FPP Bindungstasche, als auch die Peptidbindungstasche zu mehr als 50 %. Dies erklärt die Wirkung als Bisubstratinhibitor.

Durch die Kombination von qualitativer und quantitativer Analyse konnte die Aktivitäten und Selektivitäten von Inhibitoren verschiedener Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sowie der Protein-Farnesyl-Transferase durch Molecular Modelling Studien rationalisiert werden. Auf dieser Basis wurden Optimierungsvorschläge erarbeitet.

5.2 Ausblick

Durch die Einzelsynthese der beim Screening der Split-Mix-Bibliothek von GTP-Peptid-Konjugaten identifizierten Verbindungen sollte die Messung der exakten Affinität dieser Verbindungen an Ras möglich werden. Darüber hinaus bietet die Leitstruktur **95** einen guten Anhaltspunkt für die weitere Entwicklung eines kleinen Moleküls, das als Ersatz für GAP die GTPase Reaktion von Ras-Mutanten stimulieren könnte.

Die Struktur von **95** liefert auch Anhaltspunkte für das Design einer fokussierten Peptidbibliothek. Ersetzt man das zentrale Prolin durch (2R,4R)-4-Hydroxyprolin können C- und N-terminus variiert werden. Interessant könnte in diesem Zusammenhang der Einbau der in Abbildung 79 gezeigten, und in dieser Arbeit synthetisierten Hydrolyse-fördernden Kopfgruppen sein. Der Verbleib der Hydroxygruppe am Prolin sollte sich kaum Affinitäts-mindernd auswirken, da im relevanten Bereich der Ras-Oberfläche auch Wasserstoffbrücken-Akzeptoren zu finden sind und eine sterische Abstoßung nicht zu erwarten ist.

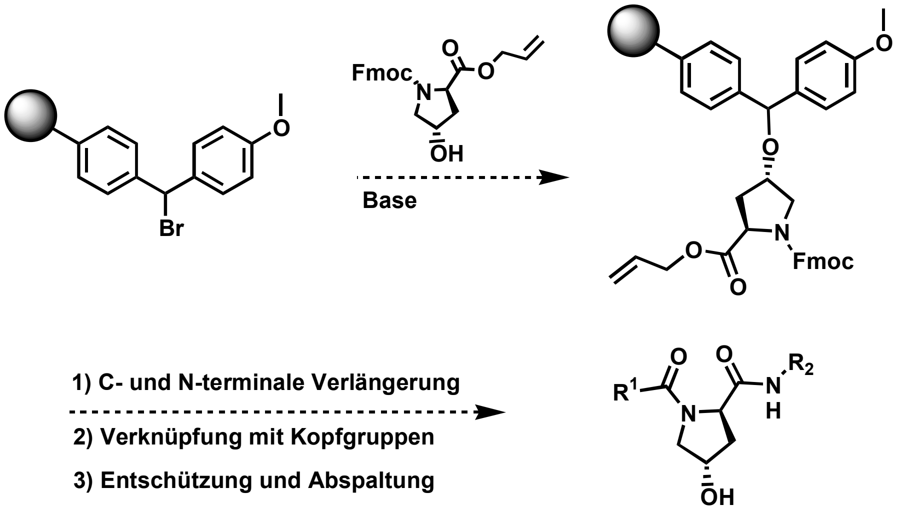


Abbildung 93: Optimierung der Leitstruktur durch kombinatorische Festphasensynthese.

Für die weitere Entwicklung der Kinaseinhibitoren stellen die in Abbildung 89 gezeigtn γ-Pyrone einen interessanten Ausgangspunkt dar. Dieses Grundgerüst würde es ermöglichen, den Selektivitäts-steuernden Einfluss der Dekalinsysteme weiterhin zu nutzen. Gleiches gilt für diie Lactame **105** und **106**. Eine Synthese und biologische Evaluierung dieser Verbindungen, wie auch der optimierten Farnesyltransferase Inhibitoren könnte die hier erarbeiteten Bindungsmodelle bestätigen und dadurch die Präzision von Molecular Modelling Vorhersagen verbessern. Letztlich könnte auch die erfolgreich Co-Kristallisation eines (optimierten) Kinaseinhibitors mit einer der hier betrachteten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen die Homologiemodelle bestätigen bzw. zu deren weiteren Verfeinerung betragten.

A model must be wrong, in some respects, else it would be the thing itself. The trick is to see where it is right. Henry A. Bent

6. Experimenteller Teil

6.1 Messgeräte und Hilfsmittel

Die ^{1}H-, ^{13}C- und ^{31}P-NMR Spektren wurden auf folgenden Geräten aufgenommen:

Varian Mercury 400	400 MHz ^{1}H-NMR, 100.6 MHz ^{13}C-NMR, 162.0 MHz ^{31}P-NMR
Bruker AM 400	400 MHz ^{1}H-NMR, 100.6 MHz ^{13}C-NMR

Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan (TMS, $\delta = 0$) als internen Standard. Die Signalmultiplizitäten sind wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, , m = Multiplett, br = verbreitertes Signal.

Die EI- und FAB-Massenspektren wurden mit einem Finnigan MAT MS 70 oder einem Jeol SX 102A Spektrometer gemessen. Angegeben sind die m/z Werte und die relativen Intensitäten. Die FAB-Spektren wurden in einer 3-NBA-Matrix gemessen.
Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einer Voyager-DE Pro BioSpectrometry™ Workstation der Firma PerSeptive Biosystems aufgenommen mit 2,5-Dihydrobenzoesäure als Matrix.

Die spezifischen Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ wurden mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 341 bestimmt und beziehen sich auf die Na-D-Linie. Die Lösungsmittel und Konzentrationen (in g/100 ml) sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben. Die Schmelzpunkte wurden mit einer Schmelzpunktmessapparatur B-540 der Firma Büchi ermittelt und sind nicht korrigiert.

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden aluminiumbeschichtete Kieselgel 60 F_{254} Platten der Firma Merck verwendet. Zur Detektion wurde UV-Licht der Wellenlänge 254 nm und zur Anfärbung nachfolgende Reagenzien eingesetzt:

Reagenz A: 12 g Phosphormolybdänsäure in 250 ml Ethanol
Reagenz B: 0.5 g Kaliumpermanganat in 100 ml Wasser
Reagenz C: I_2-Dämpfe
Reagenz D: 1.5 g Phosphormolybdänsäure, 1 g Cer-(IV)-sulfat, 6 ml konzentrierte Schwefelsäure und 94 ml Wasser

Die präparative Säulenchromatographie erfolgte mit Flash-Kieselgel (Korngröße 40-64 µM) der Firma Merck, Aluminiumoxid Typ 506C (neutral) mit einem Überdruck von 0.3-0.5 bar.

Für die gaschromatographische Analyse wurde ein HP 5890-Series II Gaschromatograph mit HP 5972-Series Mass Selective Detector der Firma Hewlett-Packard und einer Kapillarsäule Optima-1 (0.2 mm x 25 m) der Firma Macherey-Nagel mit Helium als Trägergas verwendet.
HPLC-Trennungen wurden mit einer Varian Pro Star mit einem Varian Detektor Model 340 durchgeführt. Das verwendete Acetonitril wurde in HPLC-Gradient Grade Qualität von der Firma Biosolve erworben, das Wasser wurde in MILLIPORE-Qualität verwendet. Die verwendeten Säulen und Elutionsprogramme sind den einzelnen Vorschriften zu entnehmen.
Die UV-Messungen wurden an einem Dynatech MR 5000 Photometer gemessen. Die verwendeten Chemikalien wurden bei den Firmen Fluka, Aldrich oder Acros erworben. Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert (Ausnahmen siehe unten). Die Lösungsmittel wurden wie folgt absolutiert: Dichlormethan, Triethylamin, Acetonitril und Diisopropylethylamin wurden über Calciumhydrid; Diethylether über einer geschmolzenen Natrium-Kalium-Legierung; THF über geschmolzenem Kalium, Toluol über geschmolzenem Natrium destilliert. Methanol, Aceton und 2-Propanol wurden in p.a. Qualität erworben und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Absolutes DMF wurde von der Firma Fluka bezogen und ohne weitere Behandlung eingesetzt. Für Peptidkupplungen wurde DMF Peptide Grade der Firma Biosolve verwendet. Alle Reaktionen wurden unter einer Argonatmosphäre durchgeführt.

6.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV-1: Festphasen-Peptidkupplung mit HBTU/HOBt/DIPEA

Die angegebenen Äquivalente beziehen sich auf die Anzahl freier Aminogruppen am Harz. 2,5 Äquivalente Aminosäure werden mit 5 eq. N-Ethyldiisopropylamin und 2 ml DMF(Peptide Grade) pro mmol Aminosäure versetzt und 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Die Lösung wird nach 1 min Voraktivierung zum Harz gegeben. Nach 3 h Reaktionszeit wird die Reaktionslösung aus dem Reaktor entfernt.

AAV-2: Waschen des Harzes zwischen Syntheseschritten bei der Festphasensynthese (ohne Capping)

Die angegebenen Lösungsmittelmengen beziehen sich auf 1 g Tentagel oder PS-Harz. Bei PEGA Harz ist die Lösungsmittelmenge zu verdoppeln. Nachdem die Lösung mit den Reagenzien aus dem Reaktor entfernt wurde, werden unter Argon 10 ml DMF zugegeben. Nach 1 min Schütteln wird das DMF entfernt und erneut 10 ml DMF zugegeben. Man schüttelt 2 min, entfernt die Lösungsmittel und wiederholt den Vorgang mit DCM, Methanol, erneut DMF und nochmals DCM. Anschließend kann das Harz getrocknet werden. PEGA Harz ist nach dem letzten Waschschritt in Wasser zu suspendieren und wird durch Gefriertrocknung über Nacht getrocknet. Für eine Lagerung im feuchten Zustand wird das Harz nach dem letzten DMF Waschschritt im Reaktor unter Argon im Kühlschrank gelagert.

AAV-3: Waschen des Harzes zwischen Syntheseschritten bei der Festphasensynthese (Capping mit Acetanhydrid/Pyridin)

Nach dem letzten Waschschritt mit Dichlormethan wird das Harz in einer Lösung von 10 % Acetanhydrid in abs. Pyridin suspendiert und der Reaktor 10 min. geschüttelt. Anschließend wird das Harz wie unter AAV-2 beschrieben, sorgfältig gewaschen.

AAV-4: Fmoc-Bestimmung[123]

Das Harz wird mit DMF, DCM, Methanol, DCM (je 2 mal) gewaschen und über Nacht im Feinvakuum getrocknet. 5 mg des getrockneten Harzes werden in 10 ml DMF/Piperidin suspendiert und 30 min geschüttelt. Bei Verwendung von Chlortrityl-PS-Harz sollte, zur Bestimmung der Beladung, das Harz 3 h mit DMF/Piperidin geschüttelt werden. 500 µl dieser Lösung werden in einer UV Küvette mit 2,5 ml DMF/Piperidin verdünnt und vermessen.

AAV-5: Entfernen der Fmoc-Schutzgruppen

Nach Waschen und Capping wird das Harz in einer Lösung von 20 % Piperidin in DMF suspendiert (10 ml Lösung pro 1 g Harz). Nach 10 min Schütteln wird die Lösung entfernt und das Harz erneut in einer Lösung von 20 % Piperidin in DMF suspendiert. Anschließend wird das Harz gemäß AAV-2 gewaschen.

AAV-6: Kaiser-Test[179]

Lösung 1: 5 g Ninhydrin in 100 ml abs. Ethanol

Lösung 2: 80 g Phenol in 20 ml abs. Ethanol

Lösung 3: 2 ml einer 0,001 M Lösung von KCN in Wasser wird zu 98 ml Pyridin gegeben.

Durchführung: Einige Beads werden 2 mal mit Ethanol gewaschen und mit je 2 Tropfen der 3 Lösungen versetzt. Man erhitzt vorsichtig (Abzug!) für etwa 4 Minuten auf ca. 120 °C. Blau gefärbte Beads zeigen ein positives Resultat an.

AAV-7: Spaltung des Wang-Linkers

Das trockene Harz wird in Dichlormethan suspendiert. Nach 30 Minuten Schütteln wird das Lösungsmittel entfernt und das Harz in einer Lösung von TFA/Dichlormethan/Wasser (95:2,5:2,5) suspendiert. Nach 1 h Schütteln wird die Lösung entfernt und das Harz erneut in einer Lösung von TFA/Dichlormethan/Wasser (95:2,5:2,5) suspendiert. Anschließend wird 5 mal mit Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wird eingeengt und in Toluol aufgenommen. Nach dreifacher Koevaporation mit Toluol kann das Rohprodukt gereinigt werden.

AAV-8: Analyse von Peptiden mittels HPLC-ESI-MS

Methode A: Säule Macherey-Nagel EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18 PPN
Fluß, 1 ml/min
Detektion 254 nm und IC,
Gradient: 0 min: 10% Acetonitril, 90 % H_2O → 8 min: 20% Acetonitril, 80% H_2O →18 min: 95 % Acetonitril, 5% H_2O →25 min: 95 % Acetonitril, 5% H_2O →30 min: 10% Acetonitril, 90 % H_2O.

Methode B: Säule Macherey-Nagel CC 250/4 Nucleosil 100-5 C8
Fluß, 1 ml/min
Detektion 254 nm und IC
Gradient: 0 min: 5% Acetonitril, 95 % H_2O → 4 min: 10% Acetonitril, 90% H_2O →23 min: 100 % Acetonitril, 0% H_2O →25 min: 100 % Acetonitril, 0% H_2O →30 min: 5% Acetonitril, 95 % H_2O.

AAV-9: Reinigung von Peptiden mittels präparativer HPLC

Methode A: Säule Macherey-Nagel VP 250/21 Nucleosil 100-5 C18 PPN
Fluß 15 ml/min
Detektion 215 nm
Gradient:

Methode B: Säule Macherey-Nagel VP 250/21 Nucleosil 100-5 C18 PPN
Fluß 15 ml/min
Detektion 215 nm
Gradient:

AAV-10: Reingung von GTP-Peptid-Konjugaten mittels Ionen-Austausch-Chromatographie

Die Probe wird auf eine Sephadex G75 Säule, angeschlossen an ein Varian ProStar HPLC System aufgetragen und mit einem 1M NH_4HCO_3 Puffer (pH = 7,5, linearer Gradient 3%-100% in 120 min.) eluiert. Das Produkt wird bei einer Konzentration von 0,48-0,53 M von der Säule eluiert (60. – 66. Minute). Nach Gefriertrocknung erhält man ein weißes Pulver.

6.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften – Molecular Modelling (AAV-MM)

Die angegebenen Rechenzeiten beziehen sich auf den „Origin 2000“ Rechner am MPI für molekulare Physiologie in Dortmund bei durchschnittlicher Auslastung. Rechnungen auf einer SGI O_2 dauern in der Regel länger. Die Zahlen dienen als Referenzwerte und beziehen sich auf Rechnungen mit der Struktur der Ratten-Farnesyltransferase (PDB-Code 1JCR). Die verwendeten Pfadbezeichnungen beziehen sich auf das Netzwerk des MPI in Dortmund. Die beschriebenen Skripts sind für die Verwendung mit WitnotP[180] geeignet. Skripts die von der UNIX-Kommandozeile auszuführen sind, sind also solche gekennzeichnet.

AAV-MM1: Zeichnen einer Molekülstruktur mit WitnotP, Minimierung mit CHARMM

Anwendung: Erstellen der 3-dimensionalen Struktur einer Verbindung, sowie deren Vorbereitung zur Kraftfeldminimierung

Beschreibung: Mit den im WitnotP-Untermenü „Build“ vorhandenen Optionen werden entweder Fragmente zusammengefügt, oder mit „Sketch“ neu erstellt. Da mit den Fragmenten bereits Atomparameter abgespeichert sind, ist dieser Methode der Vorzug zu geben. Nach Beendigung der Zeichnung wechselt man in das Untermenü „Modify“ und wählt „Hydrogens“ um fehlende Wasserstoffatom hinzuzufügen. Mit „Label-Bond Order“ werden schließlich alle Bindungsordnungen angezeigt und überprüft. Für eine CHARMM Minimierung müssen ein pdb und ein psf File erzeugt, die korrekten Ladungen berechnet und Atomtypen zugeordnet werden. Zur Ladungsberechnung wird die Konnektivität der einzelnen Atome betrachtet. Die Berechnung der MPEOE (Modified Partial Equalization of Orbital Electronegativity) Ladungen[181] kann von WitnotP automatisch durchgeführt werden. Namen und Nummerierung der Atome und Reste werden ebenfalls geändert und uneindeutige Zuordnungen, die CHARMM zum Abstürzen bringen zu vermeiden. Von der WitnotP Kommandozeile sind folgende Eingaben zu tätigen („mol_name“ bezieht sich auf die Bezeichnung des Moleküls, auf das diese Operation angewendet werden soll):

WitnotP:

```
modify atom lig current mol_name done
atom charge auto mol_name done
atom type auto charm mol_name done
atom q mol_name done MPEOE
atom name mol_name –done –auto seq
resnum mol_name 1
write mol2 mol_name mol_name
write xpdb mol_name mol_name
CHARMm psf mol_name mol_name
```

Diese Schritte sind im WitnotP Scripts „PRCA“ zusammengefasst[182]

Nach dem Erstellen der Dateien „mol_name.pdb“ und „mol_name.psf“ kann von der UNIX Kommandozeile aus eine CHARMM Minimierung gestartet werden. Die erforderlichen Eingaben können manuell vorgenommen oder in einem Input-File gespeichert werden.

Durch die Verwendung der unter AAV-MM3 – AAV-MM) beschriebenen Minimierungsmethoden kann dieser Prozess gestartet werden. Für einen fehlerfreien Ablauf der anschließenden Minimierung ist die korrekte Benennung aller Atome sehr wichtig. CHARMM toleriert keine zweideutigen Bezeichnungen und stürzt sofort ab. Die Namensarchitektur in WitnotP kann übertragen werden. Alle Atome sollten einen Namen mit folgender Struktur haben: /Protein_Name/Bezeichnung_der_Kette/Bezeichnung_des_Restes-/Atom_Bezeichnung (Beispiel /PFT/A/PRO_105/CA). Hat man ein kleines Molekül in die gewünschte Position gebracht und möchte diese gemeinsam mit dem Protein minimieren, sind die Ligandenatome VOR der Erstellung der CHARMM Input Datei umzubenennen. Für Minimierungen, bei denen der Inhibitor separat minimiert werden soll (z.B. mit dem Skript mimim_run), oder bei denen der Inhibitor als Referenz für die Fixierung von Proteinatomen gilt (z.B. minharmfix_run) die Atome des Inhibitors unbedingt folgende Namensstruktur aufweisen müssen: /Protein_Name/INHB/Bezeichnung_des_Restes
/Atom_Bezeichnung. Ohne „INHB“ führt die Anwendung der genannten Skripten im ungünstigsten Fall zum Systemabsturz. Man erreicht die korrekte Benennung durch folgende Eingabe.

WitnotP:

```
Move –Molecule  /name_des_inhibitor_moleküls  /Protein_Name/INHB –done
```

AAV-MM2: Vorbereitung einer Proteinstruktur für die Minimierung mit dem CHARMM Kraftfeld

Anwendung: Minimierung einer Kristallstruktur zu der Wasserstoffatome zugefügt wurden, oder Minimierung eines Protein/Liganden Komplexes.

Beschreibung: Für ein automatisches oder manuelles Docking ist eine Energie-minimierte Struktur erforderlich. Ein gegebenes Protein kann wie folgt für die Minimierung mit CHARMM vorbereitet werden.

WitnotP:

```
delete atom mol_name -atom symbol H done
modify atom charge 0 mol_name done
atom ligance ? mol_name done
atom ligance 1 mol_name -atom name ASP*/OD1,OD2 GLU*/OE1,OE2 OXT,OT1,OT2
done
atom ligance 4 mol_name -atom name LYS*/NZ done
atom ligance 3 mol_name -atom name ARG*/NE,NH1,NH2 done
atom ligance 4 mol_name -atom name N done -not mol_name -zone 1.4 mol_name -atom
name C done done done
hydrogens mol_name
atom name mol_name -done -auto hheav
atom charge automatic mol_name
atom type auto charmm mol_name done
done
atom q mol_name done MPEOE
done
write mol2 mol_name mol_name
write xpdb mol_name mol_name
CHARMm psf mol_name mol_name
```

Auch diese Anweisungen können gesammelt und der WitnotP Kommandozeile mit „ <“|pdb2c mol_name“ ausgeführt werden.[182] Hierbei wird noch zusätzlich eine Sicherungskopie des unveränderten Moleküls erstellt. Ein Abspeichern der Moleküls als mol2 Datei ist dennoch vor dem Ausführen dieses Skripts empfehlenswert. Sofern die Proteinstruktur bereits korrekt mit Wasserstoffatomen versehen wurde und auch die Protonierung von funktionellen Gruppen in Aminosäureseitenketten korrigiert wurde, kann man auch verkürzt das erforderliche Umbennenen und Zuweisen von Ladungen folgendermaßen durchführen:

WitnotP:

```
modify atom lig current mol_name done
atom charge automatic mol_name
atom name mol_name -done -auto hheav
atom type auto charmm mol_name done
done
atom q mol_name done MPEOE
done
write mol2 mol_name mol_name
write xpdb mol_name mol_name
CHARMm psf mol_name mol_name
```

Auch diese Anweisungen können gesammelt und der WitnotP Kommandozeile mit <“|pdbh2c mol_name“ ausgeführt werden.[182] Die Minimierung erfolgt in der für AAV-MM1 beschriebenen Weise. Ein manuelles Docking von Liganden wird mittels des Skripts „USE“ und der Maus durchgeführt.

AAV-MM3: Minimierung einer Proteinstruktur – ohne Einschränkungen, Conjugate Gradient

Anwendung: Minimierung einer Proteinstruktur oder eines kleinen Moleküls.

Beschreibung: Die zuvor erstellten .pdb und .psf Dateien werden automatisch in eine CHARMM-Inputdatei integriert und die Minimierung durchgeführt. Das Script ruft WitnotP auf um neben der von CHARMM erzeugten pdb Datei auch eine mol2 Datei zu erstellen.

Rechenzeit (Beispiel): Humane Farnesyltransferase im Komplex mit Pepticinammin E, 4h

Skriptname: Minall_run

Dauer: 4 h

Unix:

```
#!/bin/sh
case $# in
1) sed 's/XXXX/'$1'/' /ocg/work/mm/charmm_templ3.inp > $1.inp
  charmm < $1.inp > $1.out 2>&1
  (echo "witnotp host none << EOF";
  echo "set gnu off";
  echo "read mol $1.mol";
  echo "read coord xpdb " $1"_m.pdb $1 -done";
  echo "modify mol name * " $1"_m";
  echo "done";
  echo "write mol2 " $1"_m" $1"_m";
  echo "exit yes";
  echo "EOF") | sh >> $1.out 2>&1 ;;
 *) echo "\nWrong number of arguments !"
  echo "Usage: minall_run \"Molecule name\"\n"
esac
```

Inputdatei: charmm_templ3.inp

```
* Minimization of a single small molecule
set 1 "XXXX"
open unit 11 read form name "/ocg/work/mm/mcdlib/AMINOH.RTF"
read rtf  cards unit 11
close unit 11
open unit 12 read form name "/ocg/work/mm/mcdlib/PARM.PRM"
read param cards unit 12
close unit 12
open unit 30 read card name "@1.psf"
read psf card unit 30
```

```
close unit 30
open unit 30 read card name "@1.pdb"
read coor pdb unit 30
close unit 30
*************************************************************************
Dieser Abschnitt variiert von Input-Datei zu Input Datei, siehe auch CHARMM.doc
(IWW)
*************************************************************************
mini conj rdiel nstep 9000 tolgrad 0.05
*************************************************************************
Der Rest der Input-Datei regelt das Abspeichern der minimierten Struktur und ist für alle
Input-Dateien identisch
*************************************************************************
open write unit 42 card name "@1_m.pdb"
write coor pdb unit 42
* Minimization of molecule @1
*close unit 42
! Energy after minimisation
energy cutnb 998.0
STOP
```

In WitnotP kann die minimierte Struktur als "molekül_name_m.pdb" wieder eingelesen werden. Das Suffix „_m" wird auch durch die anderen Minimierungsmethoden erzeugt.

AAV-MM4: Minimierung einer Proteinstruktur – Mit Einschränkungen

Anwendung: Alle Atome mit einem Abstand von mehr als 5 A von einem Atom des Inhibitormoleküls werden fixiert. Näher liegende Atome sind frei beweglich.

Beschreibung: Zur Verkürzung der Rechenzeit kann bei der Minimierung von Protein/Liganden Komplexen auf die Minimierung von Teilen des Struktur verzichtet werden. Hierzu werden nur diejenigen Atome in die Berechnung mit einbezogen, die weniger als 5 A von einem Atom des Inhibitors entfernt sind.

Skriptname: Minim_run

Dauer: 1,5 h

Unix:

```
#!/bin/sh
case $# in
1) sed 's/XXXX/'$1'/' /ocg/work/mm/charmm_templ1.inp > $1.inp
  charmm < $1.inp > $1.out 2>&1
  (echo "witnotp host none << EOF";
  echo "set gnu off";
  echo "read mol $1.mol";
  echo "read coord xpdb " $1"_m.pdb $1 -done";
  echo "modify mol name * " $1"_m";
  echo "done";
  echo "write mol2 " $1"_m" $1"_m";
```

```
  echo "exit yes";
  echo "EOF") | sh >> $1.out 2>&1 ;;
 *) echo "\nWrong number of arguments !"
  echo "Usage: minim_run \"Molecule name\"\n"
esac
```

Input-Datei: charmm_templ1.inp stimmt mit charmm_templ3.inp bis auf den markierten Bereich überein.

```
*Minimization of a Protein/Ligand Complex
**************************************************************************
define FROZEN sele (all .and. .not. -
 (.byres. (segid INHB .around. 5.0))) end
cons fix sele FROZEN end
mini conj rdiel nstep 9000 tolgrad 0.05
open write unit 42 card name @1_m.pdb
write coor pdb unit 42
* Minimization of complex @1, 5 A around INHB
close unit 42
! Calculate intereatcion energy between protein and inhibitor
cons fix sele none end
interactions sele .not. segid INHB end sele segid INHB end
! Minimize Inhibitor only starting from its bound conformation
delete atom sele .not. segid INHB end
! Energy before minimisation
energy cutnb 998.0
mini conj rdiel nstep 9000 tolgrad 0.05
**************************************************************************
```

AAV-MM5: Minimierung einer Proteinstruktur – Mit Einschränkungen

Anwendung: Minimierung eines Protein/Liganden Komplexes. Die Zahl der frei beweglichen Atome um den Inhibitor bzw. Liganden herum ist größer als bei AAV-MM4, die Genauigkeit dadurch verbessert. Die Rechenzeit wird dadurch jedoch verlängert.

Beschreibung: Alle Atome mit einem Abstand von mehr als 8 A von einem Atom des Inhibitormoleküls werden fixiert. Alle anderen Proteineatome werden mit einer fiktiven Feder (Kraftkonstante = 50 kcal/mol/A) zurückgehalten.

Skriptname: Minharmfix_run

Dauer: 2,5 h

Unix:

```
#!/bin/sh
case $# in
1) sed 's/XXXX/'$1'/' /ocg/work/mm/charmm_templ1h.inp > $1.inp
  charmm < $1.inp > $1.out 2>&1
  (echo "witnotp host none << EOF";
  echo "set gnu off";
  echo "read mol $1.mol";
```

```
  echo "read coord xpdb " $1"_m.pdb $1 -done";
  echo "modify mol name * " $1"_m";
  echo "done";
  echo "write mol2 " $1"_m" $1"_m";
  echo "exit yes";
  echo "EOF") | sh >> $1.out 2>&1 ;;
 *) echo "\nWrong number of arguments !"
  echo "Usage: minharmfix_run \"Molecule name\"\n"
esac
```

Input-Datei: charmm_templ1h.inp

```
*  Minimization of a Protein/Ligand Complex
************************************************************************
define FROZEN sele (all .and. .not. -
  (.byres. (segid INHB .around. 8.0))) end
define ACTIVE sele .not. FROZEN .and.  .not. segid INHB end
cons fix sele FROZEN end
cons harm sele ACTIVE end force 50.0
mini conj rdiel nstep 9000 tolgrad 0.05
open write unit 42 card name @1_m.pdb
write coor pdb unit 42
* Minimization of complex @1, 5 A around INHB
close unit 42
! Calculate interaction energy between protein and inhibitor
cons fix sele none end
interactions sele .not. segid INHB end sele segid INHB end
! Minimize Inhibitor only starting from its bound conformation
delete atom sele .not. segid INHB end
! Energy before minimisation
energy cutnb 998.0
mini conj rdiel nstep 9000 tolgrad 0.05
************************************************************************
```

AAV-MM6: Minimierung einer Proteinstruktur – Mit Einschränkungen

Anwendung: Diese Methode eignet sich für die schnelle Minimierung von Protein/Liganden Komplexen, wenn die Proteinstruktur bereits minimiert wurde. Andernfalls ist die Verwendung von AAV-MM3, AAV-MM4 oder AAV-MM5 besser geeignet.

Beschreibung: Alle Protein Atome werden mit einer fiktiven Feder zurückgehalten. Durch die Einstellung von „force .. 50.0“ werden kleinere Veränderungen der Koordinaten der betroffenen Atome zugelassen.

Skriptname: Minfix_run

Dauer: 1h

Unix:

```
#!/bin/sh
case $# in
1) sed 's/XXXX/'$1'/' /ocg/work/mm/charmm_templ2h.inp > $1.inp
  charmm < $1.inp > $1.out 2>&1
```

```
  (echo "witnotp host none << EOF";
  echo "set gnu off";
  echo "read mol $1.mol";
  echo "read coord xpdb " $1"_m.pdb $1 -done";
  echo "modify mol name * " $1"_m";
  echo "done";
  echo "write mol2 " $1"_m" $1"_m";
  echo "exit yes";
  echo "EOF") | sh >> $1.out 2>&1 ;;
 *) echo "\nWrong number of arguments !"
  echo "Usage: minfix_run \"Molecule name\"\n"
esac
```

Input-Datei: charmm_templ2h.inp

```
 *  Minimization of a Protein/Ligand Complex
***********************************************************************
cons fix sele all .and. .not. segid INHB end force 50.0
mini conj rdiel nstep 9000 tolgrad 0.05
open write unit 42 card name @1_m.pdb
write coor pdb unit 42
close unit 42
! Calculate interaction energy between protein and inhibitor
cons fix sele none end
interactions sele .not. segid INHB end sele segid INHB end
***********************************************************************
```

AAV-MM7: Minimierung einer Proteinstruktur – Mit Einschränkungen der Backbone Atome

Anwendung: Minimierung der Atome der Seitenketten einer Proteinstruktur. Um eine Kollaps einer Tasche o.ä. zu vermeiden, werden die Backbone Atome in ihren Anfangsposition mit einer zu ihrer Masse proportionalen Kraftkonstante zurückgehalten. Dies erlaubt geringfügige Bewegungen. Ein „hydrophobic collaps“ wird so vermieden.

Beschreibung: Alle Backbone-Atome werden mit einer virtuellen Feder zurückgehalten. Die Anweisung „cons 2.0 mass“ bewirkt die Anwendung einer mit der Masse gewichteten Rückstellkraft, d.h. ein Kohlenstoffatom wird mit 24 kcal/mol/A zurückgehalten. Für die Minimierung wird die Methode des Conjugate Gradient angewendet.

Skriptname: Minfixbb_run

Dauer: 45 min

Unix:

```
#!/bin/sh
case $# in
1) sed 's/XXXX/'$1'/' /hero/work/kissau/charmm/charmm_tempfixbb.inp > $1.inp
  charmm < $1.inp > $1.out 2>&1
  (echo "witnotp host none << EOF";
```

```
  echo "set gnu off";
  echo "read mol $1.mol";
  echo "read coord xpdb " $1"_m.pdb $1 -done";
  echo "modify mol name * " $1"_m";
  echo "done";
  echo "write mol2 " $1"_m" $1"_m";
  echo "exit yes";
  echo "EOF") | sh >> $1.out 2>&1 ;;
 *) echo "\nWrong number of arguments !"
  echo "Usage: minfixbb_run \"Molecule name\"\n"
esac
```

Input-Datei: charm_tempfixbb.inp

```
**************************************************************************
cons harm force 2.0 mass sele atom * * CA end comp
cons harm force 2.0 mass sele atom * * C end comp
cons harm force 2.0 mass sele atom * * N end comp
cons harm force 2.0 mass sele atom * * O end comp
mini conj rdiel nstep 9000 tolgrad 0.05
**************************************************************************
```

AAV-MM8: Minimierung einer Proteinstruktur – Mit Einschränkungen der Backbone Atome

Anwendung: Minimierung der Atome der Seitenketten einer Proteinstruktur. Die Einschränkungen sind stärker als bei AAV-MM7. Dies verkürzt die Rechenzeit, konserviert aber etwaige Ungenauigkeiten aus der Kristallstruktur. Diese Methode ist daher nur für eine erste Betrachtung geeignet.

Beschreibung: Um eine Kollaps einer Tasche o.ä. zu vermeiden, werden die Backbone Atome in ihren Anfangsposition fixiert. Für die Minimierung wird die Methode des Conjugate Gradient angewendet.

Skriptname: Minfixbb_rigid_run

Dauer: 30 min.

Unix:

```
#!/bin/sh
case $# in
1) sed 's/XXXX/'$1'/' /ocg/work/mm/charmm_tempfixbb_rigid.inp > $1.inp
  charmm < $1.inp > $1.out 2>&1
  (echo "witnotp host none << EOF";
  echo "set gnu off";
  echo "read mol $1.mol";
  echo "read coord xpdb " $1"_m.pdb $1 -done";
  echo "modify mol name * " $1"_m";
  echo "done";
  echo "write mol2 " $1"_m" $1"_m";
```

```
  echo "exit yes";
  echo "EOF") | sh >> $1.out 2>&1 ;;
 *) echo "\nWrong number of arguments !"
  echo "Usage: minfixbb_rigid_run \"Molecule name\"\n"
esac
```

Input-Datei: charmm_tempfixbb_rigid.inp

```
************************************************************************
cons fix sele atom * * CA end comp
cons fix sele atom * * C end comp
cons fix sele atom * * N end comp
cons fix sele atom * * O end comp
mini conj rdiel nstep 9000 tolgrad 0.05
************************************************************************
```

AAV-MM9: Minimierung einer Proteinstruktur – Mit Einschränkungen der Backbone Atome

Anwendung: Minimierung der Atome der Seitenketten einer Proteinstruktur. Die Einschränkungen sind stärker als bei AAV-MM7. Dies verkürzt die Rechenzeit, konserviert aber etwaige Ungenauigkeiten aus der Kristallstruktur. Diese Methode ist daher nur für eine erste Betrachtung geeignet.

Beschreibung: Um eine Kollaps einer Tasche o.ä. zu vermeiden, werden die Backbone Atome in ihren Anfangsposition fixiert. Für die Minimierung wird die Methode des Steepest Descent angewendet und die maximalen Iterationen auf 500 begrenzt. Dies erlaubt eine kurze Minimierung auch großer Strukturen (Bsp FTase ~ 12000 Atome) in ca. 5 Minuten.

Skriptname: Minfixbb_rigid_sd_run

Dauer: 15 min.

Unix:

```
#!/bin/sh
case $# in
1) sed 's/XXXX/'$1'/' /ocg/work/mm/charmm_tempfixbb_rigid_sd.inp > $1.inp
  charmm < $1.inp > $1.out 2>&1
  (echo "witnotp host none << EOF";
  echo "set gnu off";
  echo "read mol $1.mol";
  echo "read coord xpdb " $1"_m.pdb $1 -done";
  echo "modify mol name * " $1"_m";
  echo "done";
  echo "write mol2 " $1"_m" $1"_m";
  echo "exit yes";
  echo "EOF") | sh >> $1.out 2>&1 ;;
 *) echo "\nWrong number of arguments !"
  echo "Usage: minfixbb_rigid_sd_run \"Molecule name\"\n"
esac
```

Input-Datei: charmm_tempfixbb_rigid_sd.inp

```
**********************************************************************
cons fix sele atom * * CA end comp
cons fix sele atom * * C end comp
cons fix sele atom * * N end comp
cons fix sele atom * * O end comp
cons fix sele atom * * H end comp
mini sd rdiel nstep 500 tolgrad 0.05
**********************************************************************
```

AAV-MM10: Manuelles Docking mit WitnotP

Anwendung: Manuelles Docking erfolgt mittels des Skripts „USE“, der Anweisung „freeze“, sowie Tastaturanweisungen und Mausbewegungen.

Beschreibung: Für das manuelle Docking eines Liganden in eine bestimmte Position ist es erforderlich die Bewegungen der Maus mit den Atomen des Liganden zu verknüpfen und die Atome des Proteins unbewegt zu belassen. Die Bewegung in x, y, und z Richtung erfolgt in WitnotP durch Mausbewegungen, wobei verschiedene Kombinationen der linken, mittleren und rechten Maustaste gedrückt werden müssen (siehe WitnotP_help.doc). Nach Ausführung des Skripts „USE“, wird bei gedrückter „STRG“ Taste, die Mausbewegung nur mit dem Liganden gekoppelt. Ansonsten werden alle Atome synchron bewegt. Veränderte Koordinaten müssen mittels der Anweisung „freeze“ aktualisiert werden, da WitnotP die Atome bei der nächsten Anweisung zurück in die Ausgangsposition setzt („UNDO“).

Skriptname: Use

```
#!/bin/sh
# USE sets the pivot point of a molecule to its center of mass and connects the dials or
mouse # movements to that molecule
echo " set pivot $1 COM $1 -done"
echo " select $1"
```

AAV-MM11: Berechnung und graphische Darstellung von vdW oder solvent-accessible Oberflächen

Anwendung: Vorbereitung von Proteinen für die Erstellung von Bildern bzw. zur optischen Analyse von Bindungstaschen

Beschreibung: Das Protein muss protoniert und korrekt minimiert vorliegen. Die Zahlen „0,5“ und „3,5“ definieren die Auflösung bzw. die Distanz über die das Grid über den Rand des Proteins hinaus ragt. Werte kleiner als 0,5 oder größer als 3,5 führen zu einer erheblich größeren Anforderung an die Rechenleistung und sind i.Allg. nicht sinnvoll.

Skriptname: sasurf

```
echo “ Surface grid create around mol_name –done 0.5 3.5”
echo “ Compute SaSDist 1.4 mol_name –done”
echo “ Contour color (auswählen) add mol_name surface_name end”
```

Skriptname: vdwsurf

```
echo “ Surface grid create around mol_name –done 0.5 3.5”
echo “ Compute vdwdist 1.4 mol_name –done”
echo “ Contour color (auswählen) add mol_name surface_name end”
```

Alternativ zur Angabe eines gesamten Moleküls können auch einzelne Atome mit der Maus ausgewählt werden. Nach beendeter Auswahl kann durch die Eingabe „done“ die Berechnung der Oberfläche gestartet werden. Eine Oberfläche kann einfach durch die Eingabe

„Surface delete surface_name“ entfernt werden.

Ein wiederholtes Ein- und Ausblenden geschieht entweder innerhalb des Surface-Untermenüs mit „toggle“ oder direkt im Haupmenü mit dem Script „TS.

Skriptname TS:

```
#!/bin/sh
# TS toggles a precreated surface
# Use: <”|ts surface_name”
echo " Surface toggle echo " $1" done end"
```

AAV-MM12: Berechnung der überlappenden Volumina – Connolly Package[183]

Anwendung: Berechnung des Anteils einer Tasche, die von einem Liganden ausgefüllt wird, oder des Bereichs, der von zwei Liganden belegt wird.

Beschreibung: Das Overlay beider Strukturen wird sinnvollerweise in WitnotP unter Anwendung des Skripts „USE“ durchgeführt. Die im graphischen Front-End von WitnotP auf diese Weise erzeugten Koordinaten werden durch den Befehl „freeze *“ gespeichert. Dadurch werden alle Moleküle im gleichen Koordinatensystem abgespeichert. Mit „write xpdb molecule1.pdb molecule1name“ wird das mit molecule1name bezeichnete Molekül als pdb Datei abgespeichert. Auf die gleiche Weise wird mit dem zweiten Molekül verfahren. Mittels eines Texteditors (jot oder nedit) werden beide pdb Dateien in ein einziges File kopiert, wobei die Koordinaten beider Moleküle durch ein „TER“ (keinesfalls durch END) getrennt werden müssen. Diese Datei wird als Molecule1and2.pdb abgespeichert. Die Berechnung mit PQMS kann manuell erfolgen, wird jedoch sinnvollerweise mit dem Skript „Volume_overlap“ durchgeführt. Von der UNIX-Kommandozeile wird nun die Berechnung gestartet: „Volume_overlap Molecule1and2.pdb“. In dem automatisch erzeugten Unterverzeichnis „volumes“ finden sich nun die Dateien Molecule1and2.12.area, ~.1.area sowie ~.2.area. Hier

sind die Volumina gespeichert. Die Berechnung der Schnittvolumina erfolg auf die in Kapitel 4.3.5 beschriebene Weise.

Skriptname: volume_overlap

```
#!/bin/csh -f
set angle = 1.0
set sphere = 1.4
set id = `echo $1 | cut -d"." -f1`
# split pdb file in two files containing the two molecules:
nawk '{if($1=="TER") {exit}  else {print}}' $1 > mol1.pdb
nawk 'BEGIN {i=0} {if($1=="TER") {++i;next}; if(i==1) {print}; if(i==2) {exit}}' $1 >
mol2.pdb
if (-e volumes/pqms.log) rm volumes/pqms.log
pdb2ms << EOF >>& volumes/pqms.log
read mol1.pdb
write elements.radii radius
write volumes/$id.1.ms ms
quit
EOF
pqms << EOF >>& volumes/pqms.log
molecule volumes/$id.1.ms elements.radii
probe $sphere
calculate
area volumes/$id.1.out
area volumes/$id.1.c.out bac
volume volumes/$id.1.area
quit
EOF
grep "Abnormal" volumes/pqms.log > volumes/ab.log ; if(-s volumes/ab.log) goto stop
echo "finished PQMS of 1st molecule."
pdb2ms << EOF >>& volumes/pqms.log
read mol2.pdb
write elements.radii radius
write volumes/$id.ms ms
quit
EOF
pqms << EOF >>& volumes/pqms.log
molecule volumes/$id.ms elements.radii
probe $sphere
calculate
area volumes/$id.2.out
area volumes/$id.2.c.out bac
volume volumes/$id.2.area
quit
EOF
grep "Abnormal" volumes/pqms.log > volumes/ab.log ; if(-s volumes/ab.log) goto stop
echo "finished 2nd molecule, now doing overall surface...."
cat mol1.pdb mol2.pdb > mol12.pdb
pdb2ms << EOF >>& volumes/pqms.log
read mol12.pdb
write elements.radii radius
```

```
write volumes/$id.ms ms
quit
EOF
pqms << EOF >>& volumes/pqms.log
molecule volumes/$id.ms elements.radii
probe $sphere
calculate
area volumes/$id.12.out
area volumes/$id.12.c.out bac
volume volumes/$id.12.area
quit
EOF
grep "Abnormal" volumes/pqms.log > volumes/ab.log ; if(-s volumes/ab.log) goto stop
echo "finished overall surface."
rm volumes/*.ms
if (-e mol1.pdb) rm mol1.pdb
if (-e mol2.pdb) rm mol2.pdb
if (-e mol12.pdb) rm mol12.pdb
if (-e elements.radii) rm elements.radii
exit
stop:
echo "Abnormal termination of pqms.com"
rm volumes/*.ms
if (-e mol1.pdb) rm mol1.pdb
if (-e mol2.pdb) rm mol2.pdb
if (-e mol12.pdb) rm mol12.pdb
if (-e elements.radii) rm elements.radii
```

In einem neuen Unterverzeichnis „volumes“ befinden sich nun die Dateien Mol_A_and_Mol_B.1.area, Mol_A_and_Mol_B.2.area, und Mol_A_and_Mol_B.12.area. Die hier enthaltenen Volumina werden gemäß der in Kapitel xx beschriebenen Methode in Wert der prozentualen Überlappung umgerechnet.

AAV-MM13: Analyse von Bindungsmodi – Skript „INHB-HB“

Anwendung: Analyse der gedockten Konformation eines Liganden.

Beschreibung: Zur Bewertung eines Bindungsmodus ist es ratsam, die Geometrie der Wasserstoffbrücken zu überprüfen. Die kann manuell geschehen (Untermenü „Measure“ in WitnotP) oder vereinfacht durch das script INHB-HB. Voraussetzung ist die korrekte Benennung der Moleküle. Der Ligand muß als „INHB“ bezeichnet sein, das Protein als „PROT“.

Skriptname: INHB-HB

```
echo “ display on INHB PROT done”
echo “ modify hydrogens INHB PROT done”
echo “ measure monitor hbonds 3.0 INHB done PROT done done”
```

Anschließend kann mit der Anweisung „Measure angle“ und sukzessivem Anklicken der drei beteiligten Atome der relevante Winkel α vermessen werden.

AAV-M14: Konstruktion eines Homologiemodells mit Modeller 4.0

Vorgehensweise:

1. Schritt: **Alignment der Primärsequenzen**

Automatische Verfahren zur Erstellung dieser Alignments sind unter den Namen BLAST, DIALIGN, ALIGN bekannt. Ein erstes grobes Alignment kann folgendermaßen erstellt werden:

a) Mit „pdb2seq < templat.pdb > templat.seq“ wird aus der PDB Datei des Templatproteins die Primärsequenz in eine Textdatei ohne Nummerierung abgespeichert
b) Aus Quellen wie der „SwissProt-Database“ wird die zu modellierende Sequenz im FASTA-Format abgespeichert.
c) Mit „align“ wird das entsprechende Programm gestartet und die Namen der Sequenzdateien entsprechend den Eingabeaufforderungen eingegeben.

2. Schritt: **Erstellung der Input-Dateien und Konstruktion des Modells**

Zur Ausführung des Programms „Modeller 4.0“ müssen neben der 3D Templatstruktur auch 2 weitere Input Dateien vorliegen. In der „name.top“ Datei sind allgemeine Anweisungen sowie die zu verwendenden Routinen für Modeller festzulegen. In der „name.ali“ Datei ist das Alignment der Sequenzen anzugeben. Das von „ALIGN“ erstellte Alignment ist in dieser Datei abzuspeichern und gegebenenfalls manuell zu korrigieren (sehr empfehlenswert!).
Die Ausführung des Programms erfolgt anschließend mit „mod4 name“ (wobei „name“ für die jeweils gewählte Bezeichnung der Dateien steht. Modeller 4.0 erzeugt mehrere Dateien, von denen in der Datei „name.B9999999“ die Koordinaten des Homologiemodells gespeichert sind. Da es sich hierbei um eine Datei im PDB Format handelt ist eine Umbenennung in „name.pdb“ sehr sinnvoll und für die weitere Analyse notwendig; WitnotP benötigt die korrekte Dateiendung. Dies ist am Einfachsten von der Unix Kommandozeile mit „cp name.B9999999 name.pdb“ (Enter)

3. Schritt: **Analyse des Modells**

Neben PROCHECK kann auch das Softwarepaket WHATCHECK angewendet werden.

a) Mit „whatcheck name.pdb“ wird die Analyse gestartet

b) Mit latex_old pdbout.tex“ wird aus dem WHATCHECK Output, welches aus mehreren Dateien besteht, ein zusammenhängendes Latex®-Dokument erstellt.
c) Mit „dvips –o name.ps pdbout.dvi“ wird diese Dokument in ein Postscript Format überführt.
d) Mit „gv name.ps“ kann diese Datei nun betrachtet bzw. ausgedruckt werden.

4. Schritt: **Korrektur und Wiederholung der Schritte 1-3**

Die in „name.ps“ gespeicherten Informationen sollten Aminosäure für Aminosäure überprüft werden. Einige Fehlermeldungen sind nur für Kristallographen relevant, besonderen Wert sollte aber auf Torsionswinkel und eventuell fehlende Wasserstoffbrückenpartner gelegt werden, da diese ein Hinweis auf ein teilweise inkorrektes Alignment oder falsche Konformationen sein können. Hier sollte das Alignment überprüft, korrigiert und die Schritte 1 bis 3 erneut durchgeführt werden.

AAV-MM15: Berechnung der Schnittvolumina zweier Moleküle (WitnotP)

Die Strukturen beider Moleküle werden unter Anwendung des Skriptes „USE“ übereinandergelegt (entsprechend den Bindungsmodi). Nach Aktualisierung der Koordinaten beider Moleküle (mit „freeze“) müssen die Oberflächen der beiden Moleküle manuell (getrennt und zusammen) berechnet werden. Hierzu wechselt man in das Menü „Surface“. Parallel zur graphischen Darstellung (siehe WitnotP-Bedienungsanleitung) wird das Volumen des von der Oberfläche umschlossenen Körpers angezeigt. Die Berechnung der Volumina erfolgt automatisch gemäß AAV-MM11. Die Kalkulation der Schnittvolumina erfolg auf die in Kapitel 4.3.5 beschriebene Weise. Diese Arbeitsvorschrift entspricht AAV-MM13 und ist anzuwenden, wenn das Connolly-Software Paket nicht zur Verfügung steht.

AAV-MM16: Berechnung von Hydrophobizitätsoberflächen mit WitnotP und HYDROMAP

Anwendung: Die beschriebene Vorgehensweise setzt die Installation von HYDROMAP, Witnotp und GRASP auf einem Netzserver voraus. Die angegebenen Pfade beziehen sich auf das interne Netzwerk des MPI in Dortmund.

Beschreibung: Mit “read xpdb” oder “read mol2” werden die Koordinaten in WitnotP eingelesen. Die Protonierung und Zuordnung der korrekten Parameter erfolgt mit dem Script „hydroprep“. Um Fehler zu vermeiden werden die Atome sequentiell nummeriert. Dadurch können sich Abweichungen zur ursprünglichen Datei ergeben.

Skriptname: hydroprep

```
#!/bin/sh
# Verwendung für ein Molekül "mymol":
# < "| hydroprep mymol"
echo “modify hydrogens $1 done”
echo "modify atom lig current $1 done "
echo "atom charge auto $1 done"
echo "atom type auto charmm $1 done "
echo "done"
echo "atom q $1 done MPEOE "
echo "atom name $1 -done -auto seq "
echo "resnum $1 1"
echo "done "
echo "label type $1"
echo "write mol2 $1_hyd.mol2 $1"
```

Die durch diese Anweisungen erzeugte mymol_hyd.mol2 Datei (mol2 Format) dient als Input für die eigentlichen Berechnungen mit HYDROMAP. Dieses wird von der UNIX Kommandozeile aus ausgeführt. Hierzu muß ein Unterverzeichnis „/inputs“ im jeweiligen Arbeitsverzeichnis erstellt werden. Dort müssen die Dateien „RvdwEvdw_new“, „mymol.inp“ und mymol_hyd.mol2 abgelegt werden. Die Oberfläche wird anschließend mit „hydromap inputs/myprotein.inp“ berechnet. Die graphische Darstellung erfolgt mit GRASP. Die Datei mymol.inp sollte folgendermaßen aussehen:

```
# File type: mol2 (m) or PDB (p)
m
# Path of the coordinate file
./inputs/mymol_hyd.mol2
# Path of the parameter file
./inputs/RvdwEvdw_new
# Solute dielectric
1.0
# Solvent dielectric
78.5
# Number of most hydrophobic points to save and display
50
# Radius of the probe sphere
1.4
# Scaling factor for the electrostatic desolvation
1.0
# Scaling factor for the vdW interactions
1.0
# Path of the GRASP executable
/xprog/bin/grasp
```

Die Erstellung von Abbildungen dieser Hydrophobizitätsoberflächen erfolgt mit „Snapshot“. Die Konversion in ein Windows-kompatibles .tif oder .jpg Format erfolgt mit „xv“.

AAV-MM17: Erweiterung der Monomer-Bibliothek von Pep 1.0

Anwendung: *In silico Screening* einer kombinatorischen Peptidbibliothek

Beschreibung: PEP benötigt zum Einbau von Monomeren in die wachsende Kette zunächst die 3D Struktur des Monomeren im pdb Format. Die Datei „pep.coor“ muß daher mit diesen neuen Einträgen ergänzt werden. Bei der Optimierung mittels des genetischen Algorithmus greift PEP auf die CHARMm Parameter zurück (CHARMm = kommerzielle Version, CHARMM = akademische Version). Gegebenenfalls müssen unbekannte Atome parametrisiert und die Datei „MSI_PARAM“ ergänzt werden. Die MPEOE Ladungen können mit WitnotP berechnet werden und müssen zusammen mit einer Definition der drehbaren Bindungen in der Datei „pep.rtf“ gespeichert werden (rtf = residues topology file, siehe auch PEP 1.0 Dokumentation). Dies kann manuell oder noch einfacher automatisch mittels der CHARMM Verknüpfung in WitnotP geschehen. Mit folgender Anweisung wird eine .rtf Datei mit den Namen „my_mol.rtf“ erstellt.

```
CHARMm rtf my_mol my_mol –done
```

Diese Datei muß anschließend an die pep.rtf Datei angefügt werden. Die Benennung der Monomere (drei Buchstaben) muss eineutig sein.

AAV-MM18: Graphische Analyse der PEP-Liganden

Anwendung: Modifikation des PEP-Outputs, dass dieser in WitnotP betrachtet werden kann.

Beschreibung: Die „Autobond“ Funktion von WitnotP verknüpft automatisch die Atome bekannter Fragmente, wie z.B. Aminosäuren. Die D-Aminosäuren und andere PEP Monomere sind nicht bekannt, daher werden die Monomere nach Ende der PEP-Rechnung umbenannt. Mit dem folgendem Skript ist dies automatisch möglich.

Skriptname: LigConvert

```
#!/bin/sh
# Script 'LigConvert' modifies the names of D-Aminoacid residues
# For example, LDR is converted to ARG, so that WitnotP can draw the autobonds
# Usage for a ligand called "ligand_1_0_1.pdb":
# "Ligconvert 1 1"
# Created February 8th, 2001 by Lars Kissau
# Designed for use in conjunction with the pepd.coor and pepd.rtf files
sed 's/LDA  /ALA D/' ligand_"$1"_0_"$2".pdb| sed 's/LDC  /CYS D/' | sed 's/LDD  /ASP
D/' |
sed 's/LDE  /GLU D/' | sed 's/LDF  /PHE D/' | sed 's/LDH  /HIS D/' |
sed 's/LDI  /ILE D/' | sed 's/LDK  /LYS D/' | sed 's/LDL  /LEU D/' |
sed 's/LDM  /MET D/' | sed 's/LDN  /ASN D/' | sed 's/LDP  /PRO D/' |
sed 's/LDQ  /GLN D/' | sed 's/LDR  /ARG D/' | sed 's/LDS  /SER D/' |
```

```
sed 's/LDT  /THR D/' | sed 's/LDV  /VAL D/' | sed 's/LDW  /TRP D/' |
sed 's/LDY  /TYR D/' | sed 's/LDJ  /HSD D/' > "$2"
echo "Conversion successfull - the output has been saved to" alig_"$1"_0_"$2".pdb
```

AAV-MM19: Vereinfachte Erstellung graphischer Ansichten von Proteinstrukturen

Anwendung: Erstellung von .tif oder .jpg Ansichten von Proteinen und Liganden. Diese Dateien können anschließend in Word-Dokumente etc. integriert werden.

Beschreibung: Aus einer PDB Datei kann mittels des Skriptes „Makepic“ rasch eine Molscript Darstellung erzeugt werden. Die ebenfalls automatisch erstellt „„molscr“ Datei muß lediglich durch Einträge zur gewünschten Färbung ergänzt werden (siehe Molscript Bedienungsanleitung). Anschließend kann aus der „molscr“ Datei eine hochaufgelöste Graphik im TIFF-Format erstellt werden.

Skriptname: Makepic

```
rasmol $1.pdb << EOF
cartoon
wireframe off
colour structure
write molscript $1.molscr
exit
EOF
molscript –gl –in $1.molscr
```

Nach Einstellung der Farben, sowie der Optionen Helix vs. Zylinder kann die TIFF-Graphik mit dem Skript „Maketiff“ erstellt werden:

Skriptname: Maketiff

```
molscript –r $1.molscr | render –tiff $1.tif
imageworks $1.tif
```

Die Eingaben von der UNIX-Kommandozeile für eine Datei Protein.pdb lauten:

“Makepic *Protein*” oder “Maketiff *Protein*”

AAV-MM20: Manuelle Korrektur von Bindungslänge, Bindungswinkeln und Torsionswinkeln mit WitnotP

Bei manuellem Docking von Liganden, der Korrektur von Proteinmodellen etc. kann eine Korrektur einiger Bindungsparameter erforderlich sein, beispielsweise die Rotation einer Aminosäureseitenkette. Mit der Eingabe *Bond twist* wird die Funktion zur Veränderung der Torsionswinkel aufgerufen. Mit der Maus sind nun die beiden Atome anzuklicken. Vorsicht! Die Substituenten des zweiten Atomes werden ebenfalls gedreht, d.h. beim Drehen einer

Seitenkette muß zuerst das α-C Atom und danach das β-C Atom markiert werden, sonst bleibt die Kette fixiert und das Protein dreht sich. Durch die Eingabe von Zahlenwerten kann nach aufrufen des Menüs Modify torsion auch der Torsionswinkel auf ein Grad genau modifiziert werden.

AAV-MM21: PASS-Analyse von Protein-Oberflächen. Identifikation von Bindungstasche sowie die Berechnung deren vdW-Volumina

Vorgehensweise: Die Struktur des Proteins wird gemäß AAV-MM2 und AAV-MM7 mit Wasserstoffatomen versehen und unter Fixierung der Backbone Atome minimiert. Die resultierende Struktur wird als pdb Datei (protein.pdb) abgespeichert. Von der Unix Kommandozeile aus wird die Berechnung (Installation von PASS vorausgesetzt) mit
Pass protein.pdb gestartet. In WitnotP werden nun die Atome in der Datei Protein-Probes.pdb eingelesen. Diese stellen die Schwerpunkte von Wassermolekülen dar und werden daher manuell mit einem vdW Radius von 1,4 Å versehen. Soll wie für die Definition der hydrophoben Tasche bei den Kinasen ein Teil abgegrenzt werden, geschieht dies mit

WitnotP:

copy – atoms (Anklicken) pocket –done
modify atom type C.3 pocket –done
modify hydrogens pocket –done
write xpdb pocket pocket –done

Anschließend wird das so definierte Molekül mit dem Inhibitor überlagert, die Koordinaten aktualisiert und gemäß AAV-MM12 die Überlappung berechnet.

6.4 Arbeiten zu Kapitel 4.1

Vorbereitung einer Ras Struktur fürs Modelling

Für die molecular Modelling Arbeiten in diesem Projekt wurde die Struktur des Ras-Proteins aus dem Ras-RasGAP Komplex (PDB-Code: 1WQ1) extrahiert und mit der Struktur der G12V Mutante überlagert. Aus der unvollständigen Ras-Struktur (PDB Code 5P21) wird das GTP extrahiert und in die Ras Struktur anstelle des GDP-AF_3 kopiert. Die resultierende Struktur wird für die weiteren Molecular Modelling Arbeiten verwendet. Sie entspricht der Struktur, die in Lösung bzw. in der Zelle vorliegt, aufgrund der GTP Hydrolyse aber nicht kristallisiert werden kann. Anderer Ras Kristallstrukturen waren deshalb nicht geeignet, da hier die Atome von Teilen des Switch II Region nicht lokalisiert werden konnten.

Aus der Analyse der GTPase Reaktion ist bekannt, dass die Switch II Region in einer bestimmten Konformation vorliegen muß, bzw. durch GAP (oder einen anderen Effektor) in dieser Orientierung gebracht werden muß. Die in Abbildung 16 gezeigten Strukturen wurden anschließend mit HYDROMAP und PASS berechnet und mit WitnotP und Snapshot dargestellt bzw. im TIFF Format exportiert. (Hier sind nur die Tastatureingaben wiedergegeben. Die meisten Mausbewegungen können nicht „beschrieben“ werden).

WitnotP:

```
Read xpdb 1WQ1.pdb done
Move –atom (click on GAP-ARG 789) connected done GAP done
Move –molecule 1WQ1.pdb Ras done
Delete -atom Ras/A/HOH* done
Read xpdb 5P21.pdb done
<:|”use 5P21.pdb” done
< bb
(5P21 und Ras überlagern)
Move –atom (click on GTP) connected done GTP done
Delete –atom (click on Ras-GDP-AlF4) connected done
Move –molecule GTP Ras done
<:|”pdb2c Ras”
```

Unix:

```
Minfixxbb_ridgid_sd_run Ras
```

WitnotP:

```
Delete molecule Ras pb2_save_Ras done
Read xpdb Ras_m.pdb done
Move –molecule Ras_m.pdb Ras done
Write xpdb Ras Ras done
<:|”hydroprep Ras” done
```

Unix:

```
Pass Ras done
```

Move Ras_hyd.mol Ras_hyd.mol2 done
Hydromap Ras.inp done (siehe Anhang X)
(GRASP Bild mit Snapshot und XV in TIFF Format konvertieren und abspeichern)

WitnotP:

Read Ras.probes.pdb
Set radii Ras.probes.pdb 1.4 Å done
Cpk on Ras.probes.pdb done
<:|”sasurf Ras” (siehe AAV-MM11)
(Screenshot mit „Snapshot“ und „XV“ als TIFF Format abspeichern).

Erweiterung der Monomerbibliothek von PEP 1.0

Die 19 chiralen natürlichen Aminosäuren, sowie Phenylglycin, und Ornithin wurden als D-Enantiomere mit WitnotP (AAV-MM1) gezeichnet und nach Kraftfeldminimierung (AAV-MM3) als pdb Dateien abgespeichert. Da PEP einen 3-Buchstaben Code verwendet wurden die Namen nach folgendem Schema vergeben: LDA (L = Lars, D = D-Aminosäure A = Einbuchstabencode für die Aminosäure – hier Alanin). Letztlich wurde auch die Struktur der γ-Aminobuttersäure entsprechend gezeichnet und minimiert. Für beide Histidin-Enantiomere wurden jeweils die δ und ε -protonierten Formen eingegeben, da eine Umprotonierung von PEP nicht durchgeführt werden kann. Die Definition drehbarere Bindungen, Torsionwinkel und Berechnung der MPEOE Ladungen wurden mit WitnotP durchgeführt. Und die mit CHARMm rtf erstellten Dateien an die vorhandenen Monomere in der Strukturbibliothek PEP.rtf angehängt. Die im pdb Format abgespeicherten Koordinaten wurden in die Datei PEP.coor eingefügt. Als Beispiel sei hier das Vorgehen für D-Alanin gezeigt. Alle anderen Monomere wurden auf analoge Weise in die Bibliothek eingefügt.

WitnotP:

Build fragment amino acids alanine get LDA done
Invert center CA HA CB done
“<:| prca LDA”

UNIX:

minall_run LDA

WitnotP:

delete molecule LDA done
Read molecule xpdb LDA_m.pdb done
Move –molecule LDA_m.pdb LDA done
Write xpdb LDA LDA done
CHARMm psf LDA done
Label charges MPEOE LDA - done

(Mit den anderen Resten wurde in analoger Weise verfahren). Da die in der Ras Struktur enthaltene GTP Struktur nicht Bestandteil der Standardbibliothek war, musste dieser Rest ebenfalls auf die beschriebene Weise parametrisiert werden, damit PEP die

Wechselwirkungen der Liganden mit dem gesamten Rezeptor (Ras und GTP) berechnen konnte. Die CHARMm Strukturdatei ist auf der beiliegenden CD enthalten

PEP Kalkulationen mit G12V-Ras im Komplex mit GTP

Die vorbereitete Ras-Struktur wird mit Wasserstoffatomen ergänzt und gemäß AAV-MM9 minimiert.[1] Als Seed wird Glycin manuell gemäß AAV-MM10 positioniert und im gleichen Koordinatensystem wie das Protein abgespeichert. Die Namen der Protein- und Seeddateien werden in die Inputdatei (*Pep Input Datei siehe Anhang VII)* eingetragen. Damit kann PEP ausgeführt werden.

Unix:

```
Nohup pep < pep.inp > pep_output.rtf &
```

Die Output Datei kann mit einem Texteditor oder Word betrachtet werden. Da die Output Datei ein Protokoll aller Rechenschritte enthält (ca 60 DIN A4 Seiten), ist hier nur ein Ausschnitt der 10 besten Liganden einer der 8 PEP Runs wiedergegeben.[2]

```
final stack data:
stack data
1 stacks
-------------------------------------
pos sequence RMSD rot  energy  status
-------------------------------------
stack number: 0
---------------
0  GLY  THR  LEU  TYR  ASN  12.22  0  2302  -11.21  1
1  GLY  THR  LEU  TYR  LDM  35.98  0  2304  -9.259  3
2  GLY  THR  LEU  SER  SER  14.54  0  2305  -8.293  1
3  GLY  THR  LEU  TYR  LDT  24  0  2306  -7.117  3
4  GLY  SER  LDM  CYS  LDR  13.81  0  2306  -11.41  3
5  GLY  THR  LEU  TYR  SER  24.91  0  2306  -6.85  1
6  GLY  THR  LEU  PHE  THR  19.01  0  2306  -6.67  1
7  GLY  THR  LEU  LDS  GLY  19.02  0  2307  -6.896  1
8  GLY  THR  LEU  TYR  GLN  20.26  0  2307  -5.793  1
9  GLY  THR  LEU  TYR  THR  19.73  0  2307  -5.683  1
```

[1] Das Resultat ist auf der CD als ras240402.pdb abgespeichert.

[2] Die Ergebnisse aller Runs wurde verglichen und solche Reste für die Bibliothek ausgewählt, die wiederholt positiv bewertet wurden. Alle Output Dateien sind auf der beiliegenden CD im RTF-Format abgespeichert.

Synthese der Kopfgruppen sowie Kupplung mit Testsequenzen

3,4-Dinitrobenzoesäure-n-hexylamid (10)

120 mg (0,57 mmol) 3,4-Dinitrobenzoesäure werden in 10 ml abs. Dichlormethan gelöst und mit 210 mg (0,56 mmol) HATU und 110 mg (145 µl, 0,85 mmol) N-Ethyldiisoproylamin versetzt. Nach 4 min. Rühren bei Raumtemperatur werden 63 mg (83 µl, 0,62 mmol) n-Hexylamin zugegeben und bei Raumtemperatur 14 h gerührt. Man verdünnt mit 40 ml Dichlormethan und wäscht drei mal mit ges. NH_4Cl Lösung und einmal mit ges. NaCl Lösung. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wird durch Chromatographie and Kieselgel (Eluent Cylohexan/Ethylacetat 4.1 v/v) gereinigt. Man erhält ein gelbes Öl.

Ausbeute: 110 mg (0,37 mmol) = 65,4 % d.Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v): 0,76

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 8,29 (d, 1H, Aromat, ^2J = 1,74 Hz), 8,15 (dd, 1H, Aromat, ^3J = 8.32 Hz, ^2J = 1,7 Hz), 7,98 (d, 1H, ^3J = 8,32 Hz), 6,37 (br s, 1H, N-H), 3,48 (dt, 2H, CH_2, ^3J = 5,9 Hz, ^3J = 7,2 Hz), 1,64 (ψtt, 3H, ^3J = 7,2 Hz), 1,25-1,45 (m, 7H, Hexyl), 0,87-0,93 (m, 3H, Hexyl).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 162,9 (C=O), 143,9 (C-4), 142,7 (C-3), 139,7 (C-1), 131,9 (C-6), 125,5 /C-5), 123,7 (C-2), 40,7 (C-1‘), 31,3 (C-2‘), 29,3 (C-4‘), 26,5 (C-3‘), 22.5 (C-5‘), 13,9 (C-6‘).

$C_{13}H_{17}N_3O_5$ (295,29)

FAB-MS (Glycerin): 296,4 (M+ H, 18).

3,4-Diaminobenzoesäure-n-hexylamid (11)

Methode A:

Zu einer Lösung von 50 mg (0,17 mmol) 3,4-Dinitrobenzoesäure-N-hexylamid in 2 ml DMF werden unter Argon 745 mg (3,3 mmol) $SnCl_2$ Dihydrat gegeben. Man rührt 16 h bei Raumtemperatur und verdünnt mit 100 ml Ethylacetat. Nach Waschen mit 50 ml 1N HCl und 50 ml ges. NaCl Lösung wird die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wird mittels Flash-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: 28 mg (0,11 mmol) = 65 % d.Th.

Methode B:

Zu einer Lösung von 1g (4,0 mmol) Nickel(II)acetat in 15 ml destilliertem Wasser wird bei 10 °C langsam unter kräftigem Rühren eine Lösung von 605 mg (16 mmol) $NaBH_4$ in 30 min

zugetropft. Der schwarze Niederschlag wird abfiltriert und 2 mal mit je 10 ml Wasser, und anschließend 15 ml Ethanol gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum erhält man 300 mg (2,3 mmol, Ausbeute = 58 % d. Th.) eines schwarzen Pulvers, das direkt für die folgende Reduktion eingesetzt wird. Hierzu werden 50 mg (0,17 mmol) 3,4-Dinitrobenzoesäure-N-hexylamid mit 50 mg (0,4 mmol) Ni_2B in 5 ml Methanol und 1 ml 1N HCl gelöst und 30 min auf 60 °C erwärmt. Man verdünnt mit 20 ml Wasser und stellt den pH-Wert durch Zugabe von NH_4OH-Lösung auf 9 ein. Nach Extraktion mit Ether wird die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Nach chromatographischer Reinigung an Kieselgel erhält man ein rötliches Öl.

Ausbeute: 35,5 mg (0,14 mmol) = 82 % d.Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v): 0,24

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,21 (d, 1H, Aromat, ^4J = 2,0 Hz), 7,14 (dd, 1H, Aromat. ^4J = 2,0 Hz, ^3J = 8,05 Hz), 6,68 (br s, 1H, Aromat), 6,63 (d, 1H, Aromat, 3J = 8,05 Hz), 4,24 (q, 2H, Hexyl, ^3J = 7,03 Hz), 4,18 (d, 2H, Hexyl, ^3J = 5,02 Hz), 3,45-3,55 (br s, 5 H, Hexyl), 1,30 (t, 3H, Hexyl- CH_3, ^3J = 7,02 Hz), 1,25 (s, 1H, Hexyl).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 168,3 (C=O), 137,2 (C-4), 135,6 (C-3), 124,3 (C-1), 119,5 (C-6), 115,2 (C-5), 114,1 (C-2), 43,7 (C-1'), 30,0 (C-2', C-4'), 28,5 (C-3'), 22,1 (C-5'), 15,1 (C-6').

$C_{13}H_{21}N_3O$ (235,33)

ESI-MS: 236,6 (M+H)

3,4-Bis allyloxybenzoesäureallylester (22)

Es werden 280 mg (1,82 mmol) 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 1,9 g (13,6 mmol) wasserfreies K_2CO_3 und 0,5 g (1,5 mmol) wasserfreies Cs_2CO_3 in 40 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran suspendiert und unter Argon mit 5,5 ml (63,6 mmol) Allylbromid versetzt. Man erhitzt 14 h zum Rückfluss. Der Reaktionsverlauf wird mittels GCMS kontrolliert. Ist der Umsatz vollständig, lässt man langsam abkühlen. Nach dem Abkühlen wird die gelbliche Suspension mit Ethylacetat verdünnt und mit ges. NaCl Lösung extrahiert. Die organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Man erhält einen farblosen Feststoff.

Ausbeute: 488 mg (1,78 mmol) = 98 % d. Th.

Smp.: 128 °C

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v) : 0,88

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,68 (dd, 1H, arom., ^4J = 2,01 Hz, ^3J = 8,54 Hz), 7,58 (d, 1H, arom, ^4J = 2,01 Hz), 6,89 (d, 1H, arom, ^3J = 8,53 Hz), 6,01-6,14 (m, 3H, $CH_2C\mathbf{H}{=}CH_2$),

5,36-5,48 (m, 6H, $CH_2CH=C\mathbf{H}_2$), 4,79 (dt, 2H, $C\mathbf{H}_2CH=CH_2$, ^3J = 5,78 Hz, ^4J = 1,51 Hz), 4,63-4,69 (m, 4H, $C\mathbf{H}_2CH=CH_2$).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 167,3 (C=O), 153,2 (C-4), 146,8 (C-3), 138,1, 137,8, 137,6 (CH_2-**C**H=CH_2), 124,1 (C-1), 123,5 (C-6), 116,7 (C-2), 115,8 (C-5), 115,5, 115,1, 114,8 (CH_2-CH=**C**H_2), 75,8 (Ph-O-**C**H_2-CH=CH_2), 70,2 (COO-**C**H_2-CH=CH_2).

$C_{16}H_{18}O_4$ (274,3117)

FAB-MS (3-NBA): 274,4 (M+, 30).

HRMS (FAB, 3-NBA): berechnet: 274,1205 gefunden: 274,1199.

3,4-Dihydroxybenzoesäuremethylester (20)

300 mg (1,95 mmol) 3,4-Dihydroxybenzoesäure werden in 20 ml abs. Methanol gelöst und bei 0 °C mit 709 µl (9,75 mmol, 5 eq.) $SOCl_2$ versetzt. Nach 30 min wird auf Raumtemperatur erwärmt und 3h gerührt. Man entfernt die flüchtigen Bestandteile im Vakuum. Nach zweifacher Koevaporation mit Toluol wird der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt. Man erhält einen weißen Feststoff.

Ausbeute: 315 mg (1,87 mmol) = 96 d. Th.

Smp.: 94-95 °C.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v): 0,23.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,41 (dd, 1H, arom., ^4J = 1,98 Hz, ^3J = 7,33 Hz), 7,21 (d, 1H, arom, ^4J = 1,98 Hz), 6,59 (d, 1H, arom, ^3J = 7,33 Hz), 3,95 (s, 3H, OCH_3).

$C_8H_8O_4$ (168,15)

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturwerten überein[184]

3,4-Bisallyloxybenzoesäuremethylester (21)

Es werden 150 mg (0,89 mmol) 3,4-Dihydroxybenzoesäuremethylester und 1,25 g (8,9 mmol) wasserfreies K_2CO_3 in 25 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran suspendiert und unter Argon mit 1,5 ml (17,8 mmol) Allylbromid versetzt. Man erhitzt 14 h zum Rückfluß. Der Reaktionsverlauf wird mittels GCMS kontrolliert. Ist der Umsatz vollständig, läßt man langsam abkühlen. Nach dem Abkühlen wird die gelbliche Suspension mit Ethylacetat verdünnt und mit ges. NaCl Lösung extrahiert. Die organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Man erhält einen schwach gelben Feststoff.

Ausbeute: 183 mg (0,74 mmol) =83 % d.Th.

Smp.: 120-122 °C.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v): 0,41.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,68 (dd, 1H, arom., ^4J = 2,06 Hz, ^3J = 8,42 Hz), 7,58 (d, 1H, arom, ^4J = 2,06 Hz), 6,89 (d, 1H, arom, ^3J = 8,42 Hz), 6,06-5,91 (m, 2H, $CH_2C\mathbf{H}{=}CH_2$), 5,53-5,44 (m, 4H, $CH_2CH{=}C\mathbf{H}_2$), 4,62-4,68 (m, 4H, $C\mathbf{H}_2CH{=}CH_2$), 3,75 (s, 3H, OCH_3).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 168,2 (C=O), 153,1 (C-4), 147,8 (C-3), 138,5, 137,9 (CH_2-**C**H=CH_2), 124,8 (C-1), 123,7 (C-6), 117,2 (C-2), 116,1 (C-5), 115,9, 115,2, 114,3 (CH_2-CH=**C**H_2), 73,9 (O-**C**H_2-CH=CH_2), 49,8 (O**C**H_3).

$C_{14}H_{16}O_4$

FAB-MS (3-NBA): 249,1 (M+H, 100), 248,1 (M+, 97), 217 ($M-OCH_3$+, 30).

HRMS (FAB, 3-NBA): berechnet: 248,1049 gefunden: 248,1060

HRMS (FAB, 3-NBA): berechnet für $C_{14}H_{17}O_4^+$: 249,1127 gefunden: 249,1165

3,4-Bisallyloxybenzoesäure (23)

Es werden 488 mg (1,78 mmol) 3,4-Bisallyloxybenzoesäureallylester in 20 ml THF, 2 ml Methanol und 2 ml Wasser gelöst. Man rührt 36 h bei Raumtemperatur und extrahiert anschließend mit ges. NH_4Cl- Lösung und Ethylacetat. Nach dem Trocknen der organischen Phasen mit Na_2SO_4 und Einengen im Vakuum erhält man ein gelbliches Produkt. Nach Chromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v) erhält man 360 mg eines farblosen Feststoffs.

Ausbeute: 360 mg (1,54 mmol) = 87 % d. Th.

Smp.: 134-136 °C

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 1:2 v/v): 0,58

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = δ = 7,73 (dd, 1H, Aromat, ^3J = 8,41 Hz, ^4J = 1,96 Hz), 7,62 (d, 1H, Aromat, ^4J = 1,96 Hz), 6,92 (d, 1H, Aromat, ^3J = 8,60 Hz), 6,13 (m, 2H, $CH_2C\mathbf{H}=CH_2$), 5,47 (ddt, 2H, $CH_2CH=C\mathbf{H}_2$, ^4J = 1,56 Hz, ^3J = 4,89 Hz, ^2J = 17,20 Hz), 5,35 (ddt, 2H, $CH_2CH=C\mathbf{H}_2$, ^4J = 1,56 Hz, ^3J = 4,89, ^2J = 17,20 Hz), 4,68 (ddt, 4H, $C\mathbf{H}_2CH=CH_2$, ^2J = 8,41 Hz, ^3J = 5,28 Hz, ^4J = 1,56 Hz).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 171,52 (C-1), 153,45 (C-5), 148,16 (C-4), 133,17 (C-9)*, 133,10 (C-12)*, 124,87 (C-2), 121,92 (C-7), 118,41 (C-4), 118,26 (C-3), 115,12 (C-6), 112,64 (C-10)*, 112,60 (C-13)*, 75,8 (C-8,C-11).

$C_{13}H_{14}O_4$ (234,25)

EI-MS (70 ev): 234 (M+, 100), 217 (M –OH, 7), 193 (M –Allyl, 26), 163 (, 18), 153 (M – 2 Allyl, 8), 91 (C_7H_7+, 6), 41 (Allyl, 92).

(6-Chloro-pyridine-3-carbonyl)-aminoessigsäure-tert-butylester (18a)

80 mg (0,51 mmol) 6-Chlornicotinsäure werden in 5 ml abs. Dichlormethan gelöst und bei Raumtemperatur mit 194 mg (0,51 mmol) HATU und 350 µl (1,53 mmol) N-Ethyldiisopropylamin versetzt. Nach 4 min. wird eine Lösung von 95 mg (0,56 mmol) Glycin-tert-butylester-hydrochlorid in 5 ml abs. Dichlormethan zugegeben und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Man verdünnt mit 50 ml Ethylacetat und wäscht zwei mal mit 50 ml ges. NaCl Lösung und einmal mit 50 ml destilliertem H_2O. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeengt. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1 v/v) gereinigt. Man erhält einen farblosen Feststoff.

Ausbeute: 131 mg (0,48 mmol) = 95 % d.Th.

Smp.: 114-115 °C (Zersetzung)

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v): 0,61

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 8,73 (dd, 1H, Aromat C-6, ^5J = 0,59 Hz, ^4J = 2,54), 8,03 (dd, 1H, Aromat C-4 , J = 2,54 Hz, J = 8,21 Hz), 7,34 (dd, 1H, Aromat C-3 , J = 0,59 Hz, J = 8,21 Hz), 6,77 (t, 1H, N-H, ^3J = 4,89 Hz), 4,06 (d, 2H, Gly α-CH_2, ^3J = 4,89 Hz), 1,43 (s, 9H, *tert*-Butyl-CH_3).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 169,1 (C=O Ester), 164,6 (C=O Amid), 154,7 (C-2), 148,5 (C-6), 138,1 (C-4), 128,7 (C-5), 124,5 (C-3), 83,1 (*tert*-Butyl C), 42,7 (α-C), 28.3 (**C**H_3).

$C_{12}H_{15}ClN_2O_3$ (270,71)

FAB-MS (3-NBA): 271,3 (M+H, 15), 270,2 (M+, 20).

HRMS (FAB, 3-NBA): berechnet 270,0771 gefunden 270,064.

4-Amino-3-hydroxy-benzoyl-phenylalanyl-phenylalanyl-phenylalanin (17)

Das Tripeptid wurde auf 100 mg Wang Harz (Novabiochem, Beladung 0,73 mmol/g) gemäß AAV-1 und AAV-3 synthetisiert. Nach Entschützen (AAV-5) wurde das Harz in einer Lösung von 34 mg (0,22 mmol, 3 eq) 4-Nitro-3-hydroxybenzoesäure, 76 µl (44 mmol, 6 eq.) DIEA, 83 mg (22 mmol, 3 eq.) HBTU und 5 ml DMF suspendiert und 3,5 h geschüttelt. Nach einem negativen Kaiser Test wurde das Harz in einer Lösung von 1,5 g $SnCl_2$ in 5 ml DMF suspendiert und 14 h geschüttelt. Nach Abspaltung vom Harz gemäß AAV-6 wurden die flüchtigen Bestandteile aus der Abspaltlösung entfernt, zweimal mit 20 ml Toluol koevaporiert und das Rohprodukt gemäß AAV-8 (Methode A, Retentionszeit: 8,52 min.) gereinigt.

Ausbeute: 25 mg (42 µmol) =58 % d.Th.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,35-7,10 (br m, 17 H, Aromat CH), 6,47 (br s, 1H, H-5').

$C_{34}H_{34}N_4O_6$ (594,66)

FAB-MS (3-NBA): 595,13 (M+H, 1,3).

ESI-MS: 595,1 (t = 9,3 min, Methode AAV-7, Methode A)

6-Amino-pyridine-3-carbonyl- phenylalanyl- phenylalanyl-phenylalanin (18)

Das Tripeptid wurde auf 100 mg Wang Harz (Novabiochem, Beladung 0,73 mmol/g) gemäß AAV-1 und AAV-3 synthetisiert. Nach Entschützen (AAV-5) wurde das Harz in einer Lösung von 50 mg (0,36 mmol, 5 eq) 6-Aminonicotinsäure, 137 mg (0,36 mmol, 5 eq) HBTU 125 µl (0,73 mmol, 10 eq.) DIEA und 5 ml DMF suspendiert und 4 h geschüttelt. Nach Abspaltung vom Harz gemäß AAV-6 wurden die flüchtigen Bestandteile aus der

Abspaltlösung entfernt, zweimal mit 20 ml Toluol koevaporiert und das Rohprodukt gemäß AAV-8 (Methode B, Retentionszeit: 6,43 min.) gereinigt.

Ausbeute: 28,2 mg (48 µmol) 67 % d. Th.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 8,60 (br s, 1H, Aminonicotinsäure H-2), 7,90-7,80 (m, 7H, Phe H-2, H-6, Aminonicotinsäure H-4), 7,79-7,54 (m, 9 H, Phe H-3, H-4, H-5,), 7,38 (d, 1H, Aminonicotinsäure, H-5, ^{3}J = 9,38 Hz).

$C_{33}H_{33}N_5O_5$ (579,6458)

FAB-MS (3-NBA): 580,2 (M+H, 1,7).

HRMS (FAB, 3-NBA) berechnet: 580,2560, gefunden: 580,2611.

3-Nitro-benzoesäure-9H-fluoren-9-ylmethylester (42)

1 g(5,98 mmol) 3-Nitrobenzoesäure in 5 ml abs. Methylenchlorid und 200 µl DMF werden unter Rühren mit 60 mg (0,5 mmol) DMAP und 1080 mg (6,0 mmol) Fluorenylmethanol versetzt. Man kühlt auf 0°C ab und setzt 1,02 ml (6,6 mmol) Diisopropylcarbodiimid zu. Nach 10 min Rühren bei 0°C erwärmt man auf Raumtemperatur und rührt weitere 180 min. Der ausgefallenen Harnstoff wird abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingeengt. Das Rohprodukt wird erneut in 100 ml Methylenchlorid gelöst, mit 30 ml 0,5 N HCl und 50 ml ges. $NaHCO_3$-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Eluent: Cyclohexan/Ethylacetat 9:1 v/v) erhält man einen gelben Feststoff.

Ausbeute: 1,23 g (3,57 mmol) = 60 % d.Th.

Smp.: 148 °C (Zersetzung).

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 9:1 v/v): 0,36.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 8,84 (ddd, 1H, Aromat H-2, ^{5}J = 0,39 Hz, ^{4}J = 1,56 Hz, ^{3}J = 2,15 Hz), 8,42 (ddd, 1H, H-4, ^{4}J = 1,17 Hz, ^{4}J = 2,15 Hz, ^{3}J = 8,21 Hz), 8,33 (ddd, 1H, H-6, ^{4}J = 1,17 Hz, ^{4}J = 1,56 Hz, ^{3}J = 7,63 Hz), 7,81 (dt, 2H, H-4'', H-5'', J = 0,81 Hz, J = 7,63 Hz), 7,65 (d, 1H, H-5, ^{3}J = 7,63 Hz), 7,64 (ddd, 2H, H-1'', H-8'', ^{5}J = 0,78 Hz, ^{4}J = 1,76 Hz, ^{3}J = 7,43 Hz), 7,43 (ddt, 2H, H-3'', H-6'', ^{4}J = 0,59 Hz, ^{4}J = 0,98 Hz, ^{3}J = 7,43 Hz), 7,34 (dt, 2H, H-2'', H-7'', ^{4}J = 1,17 Hz, ^{3}J = 7,43 Hz), 4,71 (d, 2H, H-1', ^{3}J = 6,84 Hz), 4,40 (t, 1H, H-9'', ^{3}J = 6,84 Hz).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 164,6 (C=O), 148,6 (C-3), 143,7 (C-9a'', C-8a''), 135,4 (C-6), 132,0 (C-4a'', C-4b'', C-1) 129,9 (C-5), 128,2 (C-1'', C-8''), 127,7 (C-2'', C-7''), 127,4 (C-4'', C-5''), 125,1 (C-3'', C-6''), 124,8 (C-2), 120,4 (C-4), 67,9 (C-9''), 47,1 (C-1').

$C_{21}H_{15}NO_4$ (345,3481)

EI-MS (70 eV): 345 [M+, 9], 178 [M – Fm, 100], 165 [Fluoren, 25], 150 [α-Spaltung, 10], 104 [α-Spaltung – NO_2, 6], 76 [C_6H_4+, 4].
HRMS (EI): berechnet: 345,1001 gefunden: 345,0990.

3-Amino-benzoesäure-9H-fluoren-9-ylmethylester (43)

120 mg (0,25 mmol) **42** werden in vollkommener Analogie zu **11** (Methode A) mit 20 eq. $SnCl_2$ Dihydrat in DMF 14 h bei Raumtemperatur reduziert. Man erhält ein dunkelrotes Öl, welches durch Chromatographie an Kieselgel (Eluent: Cyclohexan/Ethylacetat 3:1 v/v) gereinigt wird.
Ausbeute: 57 mg (0,18 mmol) = 52 % d. Th.
R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v): 0,42
^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,87-7,72 (m, 4H, C-4'', C-5''), 7,51 (dt, 2H, C-1'', C-8'', ^4J = 1,17 Hz, ^3J = 7,43 Hz), 7,38-7,25 (m, 5H, C-2'', C-3'', C-6'', C-7'', C-6,), 7,17-7,10 (m, 2H, C-2, C-5), 6,61 (m, 1H C-4), 4,91 (d, 2H, Fm-C**H**$_2$-O, ^3J = 7,23 Hz), 4,32 (t, 1H, C-1', ^3J = 7,23 Hz).
^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 167,1 (C=O), 146,6 (C-3), 141,9 (C-8a'', C-9a''), 136,7 (C-4a'', C-4b''), 131,3 (C-1), 129,2 (C-5), 128,9 (C-1'', C-8''), 127,8 (C-2'', C-7''), 127,6 (C-4'', C-5''), 125,9 (C-3'', C-6''), 120,0 (C-6), 119,5 (C-4), 115,9 (C-2), 79,8 (C-1'), 38,1 (C-9'').
$C_{21}H_{17}NO_2$ (315,37)
FAB-MS (3-NBA): 316,2 (M+H, 100).

3-(Bis-allyloxy-phosphorylamino)-benzoesäure-9H-fluoren-9-ylmethylester (44)

Zu einer Lösung von 79 µl (0,5 mmol) Chlorphosphorsäurediallylester[3] in 5 ml abs. Diethylether werden 243 mg (1,0 mmol) 3-Aminobenzoesäure-9H-fluoren-9-ylmethylester in 5 ml abs. Diethylether gegeben und nach Zugabe von weiteren 5 ml abs. Diethylether 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt. Man erhält ein schwach gelbes Öl.
Ausbeute: 93 mg (0,2 mmol) = 40 % d.Th.
R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 1:9 v/v): 0,1.

[3] Die Verbindung wurde von Herrn Dr. Courtney Aldrich synthetisiert und ein Teil davon für diesen Versuch zur Verfügung gestellt.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,82-7,76 (m, 2H, H-4'', H-5''), 7,71 (dt, 2H, H-1'', H-8'', ^{4}J = 1,17 Hz, ^{3}J = 7,43 Hz), 7,67 (ddd, 2H, H-3'', H-6'', ^{4}J = 0,98 Hz, ^{3}J = 1,76 Hz, ^{3}J = 7,43 Hz), 7,42 (t, 1H, H-6, ^{3}J = 7,43 Hz), 7,36-7,32 (m, 2H, H-2, H-5), 7,28 (ddd, 2H, H-2'', H-7'', ^{4}J = 2,35 Hz, ^{4}J = 1,17 Hz, ^{3}J = 8,02 Hz), 6,81 (d, 1H, C-4, ^{3}J = 9,19 Hz), 5,98-5,86 (m, 2H, CH_2=C**H**-CH_2), 5,33 (ddd, 2H, C**H_2**=CH-CH_2, ^{4}J = 2,93 Hz, ^{3}J = 17,01 Hz, ^{2}J = 1,56 Hz), 5,18 (ddd, 2H, C**H_2**=CH-CH_2, ^{4}J = 1,37 Hz, 3J = 10,56 Hz, ^{2}J = 2,54 Hz), 4,70-4,52 (m, 6H, C**H_2**=CH-CH_2, H-1'), 4,36 (t, 1H, Fm-CH, ^{3}J = 7,23 Hz).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 168,5 (C=O), 146,6 (C-3), 142,0 (C-8a'', C-9a''), 137,8 (CH_2-**C**H=CH_2), 136,7 (C-4a'', C-4b''), 131,2 (C-1), 129,2 (C-5), 128,9 (C-1'', C-8''), 127,8 (C-2'', C-7''), 127,6 (C-4'', C-5''), 125,9 (C-3'', C-6''), 120,0 (C-6), 119,5 (C-4), 116,3 (C-2), 115,2 (CH_2-CH=**C**H_2), 75,2 (C-1'), 70,4 (**C**H_2-CH=CH_2), 38,8 (C-9'').

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,5 MHz): δ = 3,55.

$C_{27}H_{26}NO_5P$ (475,47)

EI-MS (70 ev) : 475 (M+, 1), 315 (M – (($C_3H_5)_2$PO), 8), 178 (($C_3H_5)_2PONH_2$, 100), 165 ($C_{13}H_9$, 14), 137(H_2N-C_6H_4-CO_2H, 11), 120 (C_6H_5-CO_2H, 26),91 (C_7H_7+, 20).

FAB-MS (3-NBA): 497,15 (M + Na, 42)

3-Nitrobenzoesäure-2-trimethylsilanyl-ethylester (39)

Eine Lösung von 1,1 g (6,6 mmol) 3-Nitrobenzoesäure, 2,5 g (6,6 mmol) HBTU und 2,26 ml N-Ethyldiisopropylamin in abs. Dichlormethan wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend zu einer Lösung von 1,15 ml (8 mmol) 2-Trimethylsilanylethanol in 5 ml abs. Dichlormethan gegeben. Nach Rühren bei Raumtemperatur 14 h wird mit ges. NH_4Cl-Lösung extrahiert und das Rohprodukt über Kieselgel filtriert (Eluent: Cyclohexan). Man erhält ein gelbliches Öl.

Ausbeute: 1,42 g (5,3 mmol) = 80,3 % d.Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 v/v): 0,4

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 8,83-8,86 (m, 1H, Aromat C-2), 8,37-8,41 (m, 1H, Aromat C-5), 8,33-8,36 (m, 1H, Aromat C-4), 7,64 (t, 1H, Aromat C-6, ^{3}J = 8,01 Hz), 4,44-4,50 (m, 2H, C**H_2**-CH_2-Si($CH_3)_3$), 1,14-1,19 (m, 2H, CH_2-C**H_2**-Si($CH_3)_3$), 0,09 (s, 9H, CH_2-CH_2-Si(C**H_3**)$_3$.

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 166,1 (C=O), 149,8 (C-3), 136,7 (C-6), 133,9 (C-5), 131,0 (C-4), 128,7 (C-2), 126,0 (C-1), 65,6 (**C**H_2-CH_2-Si($CH_3)_3$), 19,0 (CH_2-**C**H_2-Si($CH_3)_3$), 0,2 (CH_2-CH_2-Si(**C**$H_3)_3$).

$C_{12}H_{17}NO_4Si$ (267,35)

FAB-MS (3-NBA): 267,4 (M+, 15).

3-Aminobenzoesäure-2-trimethylsilanyl-ethylester (40)

Eine Lösung von 1,42 g (5,3 mmol) 3-Nitrobenzoesäure-2-trimethylsilanylethylester in 150 ml Methanol p.A. wird durch Durchleiten von Argon 45 min entgast. Anschließend wird eine Spatelspitze Pd/C (10% Pd, Degussa) zugegeben und unter H_2 Atmosphäre 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Man filtriert über Celite und engt im Vakuum ein. Man erhält ein farbloses Öl.

Ausbeute: 970 mg (3,9 mmol) = 73,5 % d. Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v): 0,32

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,37-7,32 (m, 1H, Aromat C-2), 7,18-7,12 (m, 1H, Aromat C-5), (t, 1H, Aromat C-6, ^3J = 8,07 Hz), 6,75-6,67 (m, 1H, Aromat C-4), 7,34 4,32-4,39 (m, 2H, C**H**$_2$-CH_2-Si(CH_3)$_3$), 1,12-1,15 (m, 2H, CH_2-C**H**$_2$-Si(CH_3)$_3$), 0,09 (s, 9H, CH_2-CH_2-Si(C**H**$_3$)$_3$.

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 166,1 (C=O), 145,8 (C-3), 131,3 (C-1), 129,7 (C-5), 121,4 (C-6), 120,3 (C-4), 115,7 (C-2), 63,5 (**C**H_2-CH_2-Si(CH_3)$_3$), 18,7 (CH_2-**C**H_2-Si(CH_3)$_3$), 0,2 (CH_2-CH_2-Si(**C**H_3)$_3$).

$C_{12}H_{19}NO_2Si$ (237,37)

FAB-MS (3-NBA): 238,6 (M+H, 100).

3-(Bis-allyloxy-phosphorylamino)-benzoesäure-2-trimethylsilanyl-ethylester (41)

Es werden 210 mg (0,8 mmol) 3-Aminobenzoesäure-2-trimethylsilanyl-ethylester und 300 µl (2 mmol) Triethylamin in 15 ml frisch absolutiertem Toluol gelöst und mit 200 µl (1 mmol) Diallylphosphorchloridat versetzt. Man erhitzt 14 h auf 80 °C. Die Reaktionslösung wird auf ca. 5 ml eingeengt und mit Ethylacetat verdünnt. Nach Extraktion mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7) wird die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet und das erhaltene Rohprodukt an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v).

Ausbeute: 178 mg (0,45 mmol) = 56 % d. Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v): 0,23

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,69 (t, 1H, Aromat, ^3J = 1,76 Hz), 7,62 (dt, 1H, Aromat, ^4J = 1,37 Hz, ^3J = 7,43 Hz), 7,29 (t, 1H, Aromat, 3J = 8,02 Hz), 7,23 (ddd, 1H, Aromat, ^5J = 1,37 Hz, ^4J = 2,35 Hz, ^3J = 8,02 Hz), 7,03 (brd, 1H, N-H, ^3J = 9,38 Hz), 5,90 (dddd, 2H, CH_2-C**H**=CH_2, $^4J_{H-P}$ = 0,78 Hz, ^3J_E = 17,20, ^3J_Z = 10,36 Hz, 3J = 5,67 Hz,), 5,32 (ddd, 2H, CH_2-CH=C**H**$_2$ - trans, $^4J_{allyl}$ = 1,56 Hz, ^3J_E = 17,20 Hz, ^2J = 2,93 Hz,), 5,18 (ddd, 2H, CH_2-CH=C**H**$_2$ – cis, $^4J_{allyl}$ = 1,17 Hz, ^3J_Z = 10,36 Hz, ^2J = 2,93 Hz), 4,48-4,67 (br m, 4H, C**H**$_2$-CH=CH_2),

4,36-4,42 (m, 2H, C**H**$_2$-CH$_2$-Si(CH$_3$)$_3$), 1,07-1,14 (m, 2H, CH$_2$-C**H**$_2$-Si(CH$_3$)$_3$), 0,06 (s, 9H, CH$_2$-CH$_2$-Si(C**H**$_3$)$_3$).

^{13}C-NMR (CDCl$_3$, 100,6 MHz): δ = 167,9 (C=O), 141,4 (C-3), 133,8, 133,7 (Allyl, C-2'), 133,2 (C-1), 130,6 (C-5), 124,2 (C-6), 123,3 (C-4), 120,0, 119,9 (Allyl, C-3'), 119,8 (C-2), 68,8, 68,7 (Allyl, C-1'), 64,7 (**C**H$_2$-CH$_2$-Si(CH$_3$)$_3$), 18,8 (CH$_2$-**C**H$_2$-Si(CH$_3$)$_3$), -0,1 (CH$_2$-CH$_2$-Si(**C**H$_3$)$_3$).

^{31}P-NMR (CDCl$_3$, 202,5 MHz): δ = 3,74.

$C_{18}H_{28}NO_5PSi$ (397,48)

FAB-MS (3-NBA): 397,6 (M+H, 5).

3-Nitro-benzoesäure-tert-butylester (46)

Zu einer Lösung von 10,38 g (62,1 mmol) 3-Nitrobenzoesäure in 35 ml 1,4-Dioxan werden unter Kühlung 20 ml 2-Methylpropen zugegeben. Nach Zugabe von 4 ml konz. H_2SO_4 wird das Reaktionsgefäß verschlossen und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird erneut abgekühlt und mit Ethylacetat verdünnt. Nach Extraktion mit Na_2CO_3 werden die organischen Phasen mit Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Man erhält 13,4 g eines braunen Öls, das durch Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v) gereinigt wird.

Ausbeute: 11,5 g (51,5 mmol) = 82,9 % d.Th. (gelbes Öl)

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v): 0,31.

^{1}H-NMR (CDCl$_3$, 400 MHz): δ = 8,72 (t, 1H, H-2, ^{4}J = 1,76 Hz), 8,33 (ddd, 1H, H-4, ^{4}J = 2,36 Hz, ^{4}J = 1,76 Hz, ^{3}J = 8,21 Hz), 8,27 (ddd, 1H, H-6, ^{4}J = 1,61 Hz, ^{4}J = 1,56 Hz, ^{3}J = 7,8 Hz), 7,59 (dt, 1H, H-5, ^{4}J= 2,36 Hz, ^{3}J = 8,21 Hz), 1,59 (s, 9H, C(C**H**$_3$)$_3$).

^{13}C-NMR (CDCl$_3$, 100,6 MHz): δ = 163,4 (C=O), 148,1 (C-3), 135,0 (C-6), 133,7 (C-1), 129,3 (C-5), 126,8 (C-4), 124,2 (C-2), 82,4 (**C**(CH$_3$)$_3$), 28,0 (C(**C**H$_3$)$_3$).

$C_{11}H_{13}NO_4$ (223,2253)

FAB-MS (Glycerin): 223,4 (M+, 30).

3-Amino-benzoesäure-tert-butylester (47)

Zu einer Lösung von 3,10 g (13,9 mmol) 3-Nitrobenzoesäure-tertbutylester in 15 ml DMF werden 12,54 g (55,6 mmol) $SnCl_2$ Dihydrat gegeben. Man rührt 16 h bei Raumtemperatur und verdünnt mit 300 ml Ethylacetat. Nach Waschen mit 100 ml 1N HCl und 100 ml ges. NaCl Lösung wird die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wird mittels Flash-Chromatographie gereinigt

Ausbeute: 1,66 g (8,6 mmol) = 62,1 % d. Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 v/v): 0,26

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,38 (ddd, 1H, H-6, ^{4}J = 0,96 Hz, ^{4}J = 1,56 Hz, ^{3}J = 7,61 Hz), 7,31 (ddd, 1H, H-2, ^{5}J = 0,65 Hz, ^{4}J = 1,56 Hz, ^{4}J = 1,92 Hz), 7,18 (dt, 1H, H-5, ^{5}J = 0,65 Hz, ^{3}J = 7,61 Hz), 6,82 (ddd, 1H, H-4, 4J = 0,96 Hz, 4J = 1,92 Hz, ^{3}J = 7,61 Hz), 1,58 (s, 9H, C(C**H**$_3$)$_3$).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 167,2 (C=O), 146,6 (C-3), 133,5 (C-1), 129,0 (C-5), 120,1 (C-6), 119,2 (C-4), 116,8 (C-2), 78,5 (**C**(CH_3)$_3$), 28,3 (C(**C**H$_3$)$_3$).

$C_{11}H_{15}NO_2$ (193,24)

FAB-MS (3-NBA): 194,4 (M+H).

HRMS (FAB, 3-NBA): berechnet 194,1181 gefunden 194,1201.

3-(Bis-allyloxy-phosphorylamino)-benzoesäure-tert-butylester (48)

820 mg (3,7 mmol) 3-Aminobenzoesäure-tert-butylester werden durch azeotrope Destillation getrocknet (2 x 15 ml Toluol) und in 10 ml Methylenchlorid unter Argon gelöst. Nach Zugabe von 0,89 ml (6,4 mmol) Triethylamin werden 1,1 ml (3,7 mmol) Diallylphosphorchloridat in 3 ml Methylenchlorid zugegeben und 18 h zum Rückfluß erhitzt. Der Reaktionsverlauf wird mittels TLC überwacht. Man gibt etwas Celite zur Reaktionslösung und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wird direkt auf eine Kieselgelsäule aufgetragen. Nach Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 (1% Triethylamin) erhält man ein leicht gelbes Öl.

Ausbeute: 688 mg (1,95 mmol) = 53 % d. Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat/Triethylamin 80:18:2 v/v/v): 0,27

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,82-7,75 (m, 2H, H-2, H-6), 7,38 (t, 1H, C-5, ^{3}J = 7,81 Hz), 7,34-7,26 (m, 1H, H-4), 5,93 (dd, 2H, CH_2=C**H**-CH_2, ^{3}J= 5,68 Hz, ^{3}J = 11,32 Hz), 5,37 (dt, 2H, C**H$_2$**=CH-CH_2, ^{3}J = 1,41 Hz, ^{3}J = 17,01 Hz), 5,25 (d, 2H, C**H$_2$**=CH-CH_2, ^{3}J = 10,32 Hz), 4,63-4,73 (m, 4H, CH_2=CH-C**H$_2$**), 1,39 (s, 9H, C(C**H$_3$**)$_3$).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 167,2 (C=O), 146,7 (C-3), 137,5 (CH_2=**C**H-CH_2), 132,5 (C-1), 129,2 (C-5), 120,3 (C-6), 119,3 (C-4), 116,3 (C-2), 115,2 (**C**H$_2$=CH-CH_2), 73,5 (**C**(CH_3)$_3$), 70,6 (CH_2=CH-**C**H$_2$), 29,3 (C(**C**H$_3$)$_3$).

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,5 MHz): δ = 4,02.

$C_{17}H_{24}NO_5P$ (353,35)

FAB-MS (3-NBA): 354,6 (M+H, 2), 353,4 (M+, 10).

HRMS (FAB, 3-NBA): berechnet 353,1392 gefunden 353,1401

3-(Bis-allyloxy-phosphorylamino)-benzoesäure (48a)

69 mg (0,2 mmol) 3-(Bis-allyloxy-phosphorylamino)-benzoesäure-tert-butylester werden in 6 ml abs. Methylenchlorid 2 ml Triethylsilan gelöst und bei O°C mit 0,5 ml Trifluoressigsäure versetzt. Man rührt 2h bei Raumtemperatur, verdünnt mit 50 ml Toluol und entfernt die flüchtigen Bestandteile im Vakuum. Man erhält ein blassgelbes Öl.

Ausbeute: 55 mg (0,19 mmol) = 95 % d. Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat/Triethylamin 80:18:2 v/v/v): 0,14

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,83-7,75 (m, 2H, aromat CH), 7,38 (t, 1H, C-6, ^3J = 7,81 Hz), 7,33-7,25 (m, 2H, aromat), 5,93 (ddd, 2H, CH_2=C**H**-CH_2, ^3J= 5,68 Hz, ^3J = 11,32 Hz, ^2J = 22,68 Hz), 5,37 (dt, 2H, C**H**$_2$=CH-CH_2, ^3J = 1,38 Hz, ^3J = 17,11 Hz), 5,25 (d, 2H, C**H**$_2$=CH-CH_2, ^3J = 10,21 Hz), 4,74-4,53 (m, 4H, CH_2=CH-C**H**$_2$).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 172,4 (C=O), 146,5 (C-3), 137,5 (CH_2=**C**H-CH_2), 131,9 (C-1), 129,2 (C-5), 119,7 (C-6), 120,3 (C-4), 116,3 (C-2), 115,2 (**C**H_2=CH-CH_2), 70,6 (CH_2=CH-**C**H_2).

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,5 MHz): δ = 3,75.

$C_{13}H_{16}NO_5P$ (297,2436)

FAB-MS (Glycerin): 298,5 (M+H, 2)

HRMS (FAB, Glycerin): berechnet 297,0766 gefunden 297,0758.

3-(Bis-allyloxy-phosphorylamino)-benzoyl-alanin-methylester (49)

790 mg (2,24 mmol) 48 werden unter Argon 1h in 30 ml einer Lösung von TFA und Triethylsilan in Dichlormethan (67:33:2) gerührt und anschließend mit Toluol verdünnt. Man enfernt die flüchtigen Bestandteile im Vakuum und löst die Säure in 4 ml DMF. 842 mg (2,22 mmol) HBTU und 1,37 ml (8,0 mmol) N-Ethyldiisopropylamin werden hinzugegeben und 3 min gerührt. Man fügt dann eine Lösung von 313 mg (2,24 mmol) L-Alaninmethylester hydrochlorid hinzu und rührt 5 h bei rt. Die Reaktionslösung wird mit Ethylacetat verdünnt, 3 mal mit destilliertem H_2O, ges. NaCl-Lösung und nochmals Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeengt. Man erhält ein rosafarbenes Öl, welches durch Chromatographie (Dichlormethan/Methanol/Triethylamin 98:2:1) gereinigt wird.

Ausbeute: 788 mg (2,06 mmol) = 92 % d. Th.

$[\alpha]_D^{22}$ = + 13,9 (c = 0,9 in $CHCl_3$).

R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol/Triethylamin 98:2:1 v/v/v): 0,21

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,43 (s, 1H, H-2), 7,31 (dd, 1H, H-4, ^4J = 1,16 Hz, ^3J = 7,64 Hz), 7,22 (dd, 1H, H-5, ^3J = 8,01 Hz, ^3J = 7,64 Hz), 7,15 (dt, 1H, C-6, ^4J = 0,96 Hz, ^3J = 8,01

Hz), 6,95 (br d, 1H, P-NH, ^2J = 7,44 Hz), 6,84 (br d, CONH, ^2J = 9,02 Hz), 5,89-5,76 (m, 2H, CH_2-C**H**=CH_2), 5,24 (ddd, 2H, CH_2-CH=C**H**$_2$, ^4J = 1,36 Hz, ^3J = 17,16 Hz, ^2J = 2,72 Hz), 5,12 (ddd, 2H, CH_2-CH=C**H**$_2$, ^4J = 0,96 Hz, ^3J = 10,32 Hz, ^2J = 2,12 Hz), 4,72 (q, 1H, Ala-α-H, ^3J = 7,24 Hz), 4,59-4,38 (m, 4H, C**H**$_2$-CH=CH_2), 3,70 (s, 3H, OCH_3), 1,44 (d, 2H, Ala-β-H, ^3J = 7,24 Hz).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 173,6 (Ester C=O), 166,6 (Amid C=O), 140,1 (C-3), 135,1 (CH_2-**C**H=CH_2), 132,3 (C-1), 129,4 (C-5), 120,4 (C-4), 120,1 (C-6), 118,3 (CH_2-CH=**C**H$_2$), 116,5 (C-2), 67,3 (**C**H$_2$-CH=CH_2), 52,4 (Ala-α-C), 48,4 (OCH_3), 18,3 (Ala-β-C).

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,5 MHz): δ = 3,76.

$C_{17}H_{23}N_2O_6P$ (382,35)

FAB-MS (3-NBA): 383,7 (M+H, 8)

HRMS (FAB, 3-NBA): berechnet 382,1294 gefunden 382,1299.

3-Hydroxybenzoesäureallylester (54)

Es werden 2,5 g (18,1 mmol) 3-Hydroxybenzoesäure, 3,5 g (18,1 mmol) p-Toluolsulfonsäure und 12 ml (181 mmol) Allylalkohol in 100 ml Benzol p.A. gelöst und 14 h am Wasserabscheider zum Rückfluß erhitzt. Die Lösung wird eingeengt, mit 50 ml Ethylacetat verdünnt und zweimal mit jeweils 30 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat Lösung und 30 ml gesättigeter Natriumchloridlösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, eingeengt und über Kieselgel filtriert (Eluent: Cylohexan/Ethylacetat 3:1 v/v). Nach Trocknen im Ölpumpenvakuum erhält man 3,1 g eines farblosen Feststoffes.

Ausbeute: 3,1 g (17,4 mmol) = 96 % d. Th.

Smp.: 76-77 °C

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v): 0,73

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,87 (m, 1H, Aromat), 7,79 (m, 1H, Aromat), 7,32 (ddd, 1H, Aromat C-2, ^3J = 8,21 Hz, ^4J = 7,63 Hz, ^5J = 0,59 Hz) 7,26 (m, 1H, Aromat), 5,99 (m, 1H, CH_2-C**H**=CH_2), 5,3 (ddd, 1H, CH_2-CH=C**H**$_2$, ^4J = 1,56 Hz, ^3J = 17,20 Hz, ^2J = 2,54 Hz,), 5,27 (ddd, 1H, CH_2-CH=C**H**$_2$, ^4J = 1,17 Hz, ^2J = 11,18 Hz, ^2J = 2,54 Hz,), 4,81 (dt, 2H, C**H**$_2$-CH=CH_2, ^3J = 5,87 Hz, ^4J = 1,56 Hz).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 165,3 (C=O), 150,70 (C-3), 141,67 (CH_2-**C**H=CH_2), 132,2 (C-1), 127,9 (C-5), 121,4 (C-6), 120,2 (C-4), 118,8 (CH_2-CH=**C**H$_2$), 117, 5 (C-2), 66,1 (**C**H$_2$-CH=CH_2).

$C_{10}H_{10}O_3$ (178,18)

FAB-MS (3-NBA): 179,3 (M+H).

Di-(2-cyanoethoxy)-N,N-diisopropyl-phosphoramidit (52a)

Zu einer Lösung von 580 µl (0,58 g, 3,5 mmol) Dichlor-N,N-diisopropylphosphoramidit in 10 ml abs. THF wird bei –78 °C langsam eine Lösung von 470 µl (7,0 mmol) 2-Hydroxypropionitril und 1,2 ml (7,0 mmol) DIEA in 15 ml abs. THF gegeben. Nach 2h wird die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt und nach weiteren 30 Minuten mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 7) extrahiert.

Ausbeute: 436 mg (1,6 mmol) = 46 % d.Th.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 3,81 (m, 4H, NC-CH$_2$-C**H**$_2$-O), 3,59 (m, 2H, N-C**H**(CH$_3$)$_2$), 2,63 (t, 4H, NC-C**H**$_2$-CH$_2$-O, ^3J = 6,27 Hz), 1,17 (d, 12 H, N-CH(C**H**$_3$)$_2$, ^3J = 6,84 Hz).

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,5 MHz): δ = 150,15.

Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturangaben überein.[117]

3-[Bis-(2-cyano-ethoxy)-phosphoryloxy]-benzoic acid allyl ester (57)

Zu einer Lösung von 60 mg (0,33 mmol) **54** in 6 ml Dichlormethan wird bei 0 °C eine Lösung von 436 mg (1,6 mmol) **52a** und 280 mg (4 mmol) Tetrazol (14 h am Feinvakuum getrocknet) in 6 ml Dichlormethan gegeben und 30 min gerührt. Anschließend wird auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 4 h gerührt. Die Reaktionsmischung wird auf –30 °C abgekühlt und langsam 330 µl (1,65 mmol) einer 5M Lösung von tBuOOH in Decan zugetropft und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 10%iger Na_2SO_3 Lösung gewaschen und mit pH 7 Phosphatpuffer und Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Bei der chromatographischen Reinigung werden unpolare Nebenprodukte zunächst mit Cyclohexan eluiert, danach mit 1:1 das Produkt eluiert. Man erhält nach Einengen der Fraktionen ein farbloses Öl.

Ausbeute: 58 mg (0,16 mmol) = 49 % d. Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v): 0,19.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,52 (dd, 1H, H-6, J = 1,56 Hz, J = 0,98 Hz), 7,49-7,47 (m, 1H, H-2), 7,21 (, H-5), 7,00 (ddd, H-4, J = 0,98 Hz, J = 2,54 Hz, J = 8,21 Hz), 5,95 (m, 1H, CH$_2$-C**H**=CH$_2$), 5,34 (ddd, 1H, CH$_2$-CH=C**H**$_2$, ^4J = 1,56 Hz, ^3J = 17,20 Hz, ^2J = 3,01 Hz), 5,21 (ddd, 1H, CH$_2$-CH=C**H**$_2$, ^4J = 1,37 Hz, ^3J = 10,35 Hz, ^2J = 3,01 Hz), 4,73 (dt, 2H, C**H**$_2$-CH=CH$_2$, ^4J = 1,56 Hz, ^3J = 5,67 Hz), 4,28 (dt, 2H, NC-CH$_2$-C**H**$_2$-O, ^3J = 6,06 Hz, $^3J_{H-P}$ = 8,02 Hz), 2,75 (dt, 2H, NC-C**H**$_2$-CH$_2$-O, ^3J = 6,06 Hz, $^4J_{H-P}$ = 1,17 Hz), **^{31}P-NMR** ($CDCl_3$, 202,5 MHz): δ = -2,1.

$C_{16}H_{17}N_2O_6P$ (364,29)

Difluorenylmethyl-N,N-diisopropyl-phosphoramidit (52b)

50 ml PCl_3 werden mittels Durchleiten von Argon für 30 min entgast und anschließend unter striktem Feuchtigkeitsausschluß destilliert. Eine Lösung von 29,32 ml (21,02 g, 207,74 mmol) Diisopropylamin (frisch über KOH getrocknet) in 80 ml abs. Diethylether wird bei O°C langsam in 30 min. zu einer kräftig gerührten Lösung von 22,19 ml (13,87 g, 102,7 mmol) PCl_3 in 300 ml abs. Diethylether zugetropft. Es entsteht ein weißer Niederschlag. Die Suspension wird weitere 2h bei 0°C gerührt, danach 1h bei Raumtemperatur. Der Niederschlag wird mit einer Schlenk-Fritte abgetrennt und das Filtrat im Vakuum bis auf ca. 50 ml Volumen eingeengt. Das Produkt wird durch Destillation bei 17 mbar (Siedepunkt 74-76 °C) isoliert. Man erhält 14,86 g (73,9 mmol, 72 % d. Th.) eines farblosen Öls (Dichlor-N,N-diisopropyl-phosphoramidit), das weiter umgesetzt oder bei –30 °C bis zu 6 Wochen gelagert werden kann.

2,0 g (10 mmol) Dichlor-N,N-diisopropyl-phosphoramidit werden in 10 ml abs. THF gelöst und bei 0°C in 15 min mit einer Lösung von 3,93 g (20 mmol) Fluorenylmethanol und 5,0 ml (30 mmol) N-Ethyldiisopropylamin in 70 ml THF versetzt. Man rührt weitere 30 min. bei Raumtemperatur, verdünnt mit 300 ml Ethylacetat und extrahiert mit pH 7,0 Phosphatpuffer (3 mal mit je 50 ml). Die organische Phase wird mit ges. NaCl Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeengt. Nach Flash-Chromatographie an deaktiviertem Kieselgel (10 % Triethylamin, Eluent: Cyclohexan/Ethylacetat/Triethylamin 20:1:1 v/v/v) erhält man ein blassgelbes, hochviskoses Öl.

Ausbeute: 2,5 g (4,8 mmol) = 48 % d.Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 20:1 v/v): 0,21

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,78 (t, 4H, Fm, ^3J = 6,84 Hz), 7,72-7,65 (m, 4H, Fm), 7,45-7,36 (m, 4H, Fm), 7,33 (ddd, 4H, Fm, ^4J = 1,17 Hz, ^4J = 7,63 Hz, ^3J = 15,05 Hz), 4,12 (t, 2H, H-2'', H-7'', ^3J = 7,04 Hz), 4,06 (dt, 2H, H-1', ^3J = 6,65 Hz, ^3J = 9,78 Hz), 3,86 (dt, 2H, H-9', ^3J = 7,23 Hz, ^3J = 9,97 Hz), 2,40 (br s, 2H, C**H**(CH_3)$_2$), 1,20 (d, 6H, CH(C**H**$_3$)$_2$, ^3J = 6,84 Hz).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 141,9 (C-8a'', C-9a''), 137,1 (C-4a'', C-4b''), 128,9, 128,9, 127,3, 126,5 (C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'', C-6'', C-7'', C-8''), 70,3 (C-1'), 41,6 (C-9''), 36,3 (**C**H(CH_3)$_2$), 24,0 (CH(**C**H$_3$)$_2$).

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,5 MHz): δ = 147,4.

$C_{34}H_{36}NO_2P$ (521,63)

Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturangaben überein.[169]

3-[Bis-(9H-fluoren-9-ylmethoxy)-phosphoryloxy]-benzoesäure-allylester (55)

Zu einer Lösung von 35 mg (0,19 mmol) 3-Hydroxybenzoesäureallylester und 15 mg (0,2 mmol) Tetrazol in 6 ml abs. Dichlormethan wird bei 0 °C eine Lösung von 200 mg (0,38 mmol) Difluorenylmethyl-N,N-diisopropyl-phosphoramidit in 9 ml abs. Dichlormethan in 5 min. zugetropft und 1 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wird auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 3 h wird eine Lösung von 18 mg (1,0 mmol) t-Butylhydroperoxid in n-Hexan zugegeben und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Man extrahiert mit ges. $NaHSO_3$ Lösung sowie zweimal mit ges. $NaHCO_3$ Lösung und trocknet die organische Phase über Na_2SO_4. Nach Chromatographie an Kieselgel werden 10 mg Edukt und 32 mg Produkt isoliert.

Ausbeute: 32 mg (0,05 mmol) = 38,5 % d.Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v) : 0,25.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,87 (m, 1H, H-6), 7,79 (m, 1H, H-2), 7,71 (ddt, 4H, H-4'', H-5'', ^3J = 7,63 Hz, ^4J = 1,76 Hz, ^5J = 0,78 Hz), 7,47 (dddd, 4H, H-3'', H-6'', ^3J = 9,38 Hz, ^3J = 7,43 Hz, ^4J = 1,76 Hz, ^5J = 0,98 Hz), 7,36 (ddt, 4H, H-1'', H-8'', ^3J = 7,43 Hz, ^4J = 1,17 Hz, ^5J = 0,59 Hz), 7,32 (ddd, 1H, H-5-2, ^3J = 8,21 Hz, ^4J = 7,63 Hz, ^5J = 0,59 Hz), 7,24 (ddd, 4H, H-2'', H-7'', ^3J = 15,45 Hz, ^4J = 7,63 Hz, ^4J = 1,17 Hz), 7,26 (m, 1H, H-4), 5,99 (m, 1H, CH_2-C**H**=CH_2), 5,3 (ddd, 1H, CH_2-CH=C**H_2**, ^4J = 1,56 Hz, ^3J = 17,20 Hz, ^2J = 2,54 Hz), 5,27 (ddd, 1H, CH_2-CH=C**H_2**, ^4J = 1,17 Hz, ^3J = 10,32 Hz, ^2J = 2,54 Hz), 4,81 (dt, 2H, C**H_2**-CH=CH_2, ^3J = 5,87 Hz, ^4J = 1,56 Hz), 4,36 (dd, 4H, Fm-C**H_2**, ^3J = 6,06 Hz, ^2J = 1,17 Hz), 4,14 (t, 2H, C-9'', ^3J = 6,06 Hz)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 165,3 (C=O), 150,70 (C-3), 143,0 (C-8a,C-9a), 142,98 (C-4a,b), 141,67 (CH_2-**C**H=CH_2), 132,2 (C-1), 130,0 (C-1'', C-8''), 127,9 (C-5), 127,6 (C-2'', C-7''), 127,3 (C-4'', C-5''), 124,7 (C-3'', C-6''), 121,4 (C-6), 120,2 (C-4), 118,8 (CH_2-CH=**C**H_2), 117, 5 (C-2), 70,2 (Fm-CH_2), 66,1 (**C**H_2-CH=CH_2), 48,0 (C-9'').

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,2 MHz): δ = -0,68.

$C_{38}H_{31}O_6P$ (614,62)

FAB-MS (3-NBA): 614,7 (M+H, 3).

4-[Bis-(9H-fluoren-9-ylmethoxy)-phosphoryloxymethyl]-benzoesäure (61)

220 mg (1,45 mmol) 4-Hydroxymethylbenzoesäure und 203 mg (2,9 mmol) frisch getrocknetes Tetrazol werden in 17 ml abs. Acetonitril gelöst und langsam mit einer Lösung von 756 mg (1,45 mmol) Amidit in 3 ml abs. Methylenchlorid versetzt. Nach 4 h Rühren bei Raumtemperatur werden bei –30 °C langsam 580 µl (2,9 mmol) einer 5M Lösung von tBuOOH in Decan zugetropft und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung

wird mit 10%iger Na_2SO_3 Lösung gewaschen und mit pH 7 Phosphatpuffer und Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Bei der chromatographischen Reinigung werden unpolare Nebenprodukte zunächst mit Cyclohexan eluiert, danach mit Cyclohexan/Ethylacetat (1:1, v/v) das Produkt eluiert. Man erhält nach Einengen der Fraktionen ein farbloses Öl.

Ausbeute: 310 mg (0,55 mmol) = 38 % d. Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 1:2 v/v): 0,34

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 8,08-8-03 (m, 2H, H-2, H-6), 7,72 (dd, 4H, H-4'', H-5'', ^4J = 6,65 Hz, ^3J = 7,43 Hz), 7,50 (ddd, 4H, H-1'', H-8'', ^3J = 15,84 Hz, ^4J = 7,43 Hz, ^5J = 0,59 Hz), 7,37 (dt, 4H, H-3'', H-6'', ^4J = 7,23 Hz, ^3J = 12,12 Hz), 7,31-7,28 (m, 6H, H-3, H-5, H-2'', H-7''), 4,89 (d, 2H, Ph-C**H**$_2$-O-P, $^3J_{H-P}$ = 8,41 Hz), 4,36-4,26 (m, 4H, Fm-CH_2), 4,18-4,08 (m, 2H, C-9'').

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 170,6 (C=O), 142,2 (C-3), 141,6 (C-8a'',C-9a''), 141,4 (C-4a'', C-4b''), 130,6 (C-1), 129,9 (C-1'', C-8''), 128,7 (C-5), 127,5 (C-2'', C-7''), 127,3 (C-4'', C-5''), 125,3 (C-3'', C-6''), 121,4 (C-6), 120,2 (C-4), 118, 5 (C-2), 69,6 (Fm-CH_2), 68,1 (Ph-**C**H_2-O), 48,5 (C-9'').

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,2 MHz): δ = -0,68.

$C_{36}H_{29}O_6P$ (588,59)

FAB-MS (3-NBA): 589,8 (M+H).

4-Hydroxymethyl-benzoesäureallylester (60)

204 mg (1,3 mmol) 4-Hydroxymethylbenzoesäure werden in 3 ml abs. DMF gelöst und mit 423 mg (1,3 mmol) Cs_2CO_3 und 115 µl (1,4 mmol) Allylbromid versetzt. Man rührt 14 h bei Raumtemperatur und verdünnt die Reaktionsmischung mit 50 ml Ethylacetat. Nach Extraktion mit 1N HCl (2 mal 30 ml) und Wasser (2 mal 40 ml) wird die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung erhält man ein farbloses Öl.

Ausbeute: 240 mg (1,25 mmol) = 96 % d. Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v): 0,58.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,92 (d, 2H, C-2, C-6, ^3J = 7,32 Hz), 7,33 (d, 2H, C-3, C-5, ^3J = 7,32 Hz), 6,02 (m, 1H, CH_2-C**H**=CH_2), 5,17 (m, 2H, CH_2-CH=C**H**$_2$), 4,99 (m, 2H, C**H**$_2$-CH=CH_2), 4,72 (s, 2H, Ph-C**H**$_2$-OH).

$C_{11}H_{12}O_3$ (192,21)

ESI-MS: 193,41 (M+H).

Die Meßwerte stimmen mit den Literaturangaben überein [185]

[3-(tert-Butyl-diphenyl-silanyloxymethyl)-phenyl]-methanol (79)

In einem 25 ml Zweihalskolben werden bei Raumtemperatur 500 mg (3,62 mmol) 3-Hydroxymethylbenzylalkohol und 493 mg (7,24 mmol) frisch getrocknetes Imidazol in 2 ml wasserfreiem Dimethylformamid gelöst und bei Raumtemperatur mit 0,95 ml tert-Butyl-diphenylsilylchlorid versetzt. Nach 2 h Rühren bei 50 °C und 2 h Rühren bei Raumtemperatur wird mit 50 ml säurefreiem Ethylacetat verdünnt und mit ges. NaCl Lösung (3 x 50 ml) extrahiert. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeengt. Nach Reinigung durch Flash-Chromatographie (Säulendurchmesser 4cm, H 15 cm, 300 ml Cyclohexan/Ethylacetat 9:1 dann 500 ml Cyclohexan/Ethylacetat 1:1, danach 500 ml Ethylacetat) erhält man 820 mg eines farblosen Öls.

Ausbeute: 820 mg (2,17 mmol) = 60 % d. Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v): 0,71

(Cyclohexan/Ethylacetat 9:1 v/v): 0,18

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,75-7,80 (m, 4H, Aromat), 7,40-7,52 (m, 6H, Aromat), 7,32-7,39 (m, 3H, Aromat), 7,26-7,32 (m, 1H, Aromat), 4,85 (s, 2H, Ph-C**H**$_2$-O-Si), 4,69 (s, 2H, Ph-C**H**$_2$-OH), 2,05 (s, 1H, OH), 1,18 (s, 9H, Si-C(C**H**$_3$)$_3$).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 141,6 (C-1), 141,1 (C-3), 135,89 (Si-Ph –ortho), 133,8 (Si-Ph-meta), 130,0 (Si-Ph-para), 128,7 (C-5) 128,0 (C-4), 125,6 (C-6), 124,9 (C-2), 65,8 (C**H**$_2$-O-Si), 27,2 (Si-C(**C**H$_3$)$_3$), 19,6 (Si-**C**(CH$_3$)$_3$).

$C_{24}H_{28}O_2Si$ (376,56)

FAB-MS (3-NBA): 377,8 (M+H, 5).

Phosphorsäure 3-(tert-butyl-diphenyl-silanyloxymethyl)-benzyl ester bis-(9H-fluoren-9-ylmethyl) ester (80)

Zu einer Lösung von 200 mg (0,52 mmol) **79** und 74 mg trockenem Tetrazol in 7 ml abs. Acetonitril werden bei Raumtemperatur in 2 min 3 ml einer Lösung von 277 mg (0,53 mmol) **52b** in 3 ml abs. Methylenchlorid getropft und 4 h gerührt. Der Reaktionsfortschritt wird mittels TLC kontrolliert (Cyclohexan/Ethylacetat 9:1). Anschließend wird eine Lösung von 5 Äquivalenten ^{t}BuOOH in Decan bei –30 °C zugetropft und die Lösung 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Man verdünnt die Reaktionsmischung mit 50 ml Ethylacetat und gießt in 50 ml 10% Na_2SO_3 Lösung. Man wäscht 2 mal mit pH 7 Phosphatpuffer und ges. NaCl Lösung, trocknet die organischen Phasen über Na_2SO_4, engt im Vakuum ein und reinigt mittels Flash-Chromatographie (500 ml CH:EE 9:1, 250 ml CH:EE 1:1)

Ausbeute: 313 mg (0,40 mmol) = 75 % d. Th.-

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 9:1) = 0,1

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,68-7,74 (m, 8H, H-4'',H-5'', TBDPS H-2'', H-6''), 7,47 (ddd, 4H, H-2'', H-7'', ^3J = 8,62 Hz, ^4J = 1,76 Hz, ^5J = 0,98 Hz), 7,41-7,46 (m, 2H, H-4, H-6), 7,30-7,40 (m, 10H, TBDPS H-3', H-4', H-5', H-1'', H-8'', H-3'', H-6''), 7,25 (dd, 4 H, H-2'', H-7'', ^4J = 3,32 Hz, ^3J = 7,43 Hz), 7,15-7,21 (m, 2H, H-2, H-5), 4,92 (d, 2H, Ph-C**H**$_2$-OPO(OR)$_2$, ^3J = 8,02 Hz), 4,75 (s, 2H, Ph-C**H**$_2$-OTBDPS), 4,24 (t, 4H, Fm-C**H**$_2$, ^3J = 6,06 Hz), 4,13 (m, 2H, H-9''), 1,11 (s, 9H, Si(Ph)$_2$C(C**H**$_3$)$_3$).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 143,3 (C-8a'',C-9a'') 141,7 (C-1, C-3), 135,9 (C-2', C-6'), 135,8 (C-4a', C-4b'), 133,6 (C-1'), 129,9 (C-4'), 128,8 (C-3', C-5'), 128,1 (C-5), 128,0 (C-1'', C-8''), 127,9 (C-2'', C-7''), 127,6 (C-4'', C-5''), 126,3 (C-4, C-6), 125,6, 125,2, 120,2 (C-2, C-3'', C-6''), 69,4 (Fm-**C**H$_2$), 69,3 (Ph-**C**H$_2$-OPO(OR)$_2$, 65,4 (Ph-**C**H$_2$-Si), 48,1 (C-9''), 27,2, (SiC(**C**H$_3$)$_3$), 14,4 (Si**C**(CH$_3$)$_3$).

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,2 MHz): δ = -0,42 .

$C_{52}H_{49}O_5PSi$ (813,00)

FAB-MS (3-NBA): 813,1 (M+, 4).

Phosphorsäure-bis-(9H-fluoren-9-ylmethyl) ester 3-hydroxymethyl-benzylester (81)

16,8 mg (20 µmol) 438 wurden in 10 ml abs. THF gelöst und in einem 2 ml Eppendorf SafeLock® mit 174 µl einer 70 %igen Lösung von Fluorwasserstoff in Pyridin versetzt. Der Reaktionsfortschritt wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht. Nach 5 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird mit 20 ml Ethylacetat verdünnt und mit je 10 ml gesättigter $NaHCO_3$-Lösung, gesättigter NH_4Cl-Lösung, gesättigter NaCl-Lösung und H_2O gewaschen. Die organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeengt. Das gelbe Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (Eluent: Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 10,2 mg (17,7 µmol) = 86 % d. Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v): 0,13.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,72 (t, 4H, H-4'', H-5'', ^3J = 6,65 Hz), 7,49 (dd, 4H, H-1'', H-8'', ^4J = 7,43 Hz, ^3J = 11,34 Hz), 7,33-7,43 (m, 4H, H-3'', H-6''), 7,23-7,33 (m, 7H, H-2'', H-7'', H-4, H-5, H-6), 7,17 (br s; 1H, H-2), 4,69 (d, 2H, Ph-C**H**$_2$-OPO(OR)$_2$, $^3J_{H-P}$ = 8,6 Hz), 4,63 (s, 2H, Ph-C**H**$_2$-OH), 4,22 (d, 4H, Fm-CH$_2$, ^3J = 6,43 Hz), 4,10 (t, 2H, H-9'', ^3J = 6,43 Hz).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 143,7 (C-8a'',C-9a'') 141,1 (C-1, C-3), 135,8 (C-4a'', C-4b''), 128,1 (C-5), 128,0 (C-1'', C-8''), 127,9 (C-2'', C-7''), 127,6 (C-4'', C-5''), 126,3 (C-4), 125,7 (C-6), 125,4, 124,9, 120,2, (C-2, C-3'', C-6''), 69,4 (Fm-**C**H_2), 69,3 (Ph-**C**H_2-OPO$(OR)_2$, 62,1 (Ph-**C**H_2-OH), 48,1 (C-9'').
^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,2 MHz): δ = -0,46
$C_{36}H_{31}O_5P$ (574,60)
FAB-MS (3-NBA): 574,7 (M+, 9).

3-Methyl-benzoesäure-tert-butylester (63)

Zu einer Lösung von 14,35g (105,5 mmol) 3-Methylbenzoesäure in 35 ml 1,4-Dioxan werden unter Kühlung 20 ml 2-Methylpropen zugegeben. Nach Zugabe von 4 ml konz. H_2SO_4 wird das Reaktionsgefäß verschlossen und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird erneut abgekühlt und mit Ethylacetat verdünnt. Nach Extraktion mit Na_2CO_3 werden die organischen Phasen mit Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Man erhält 19,8 g eines braunen Öls, das durch Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat 99:1 v/v) gereinigt wird.
Ausbeute: 13,7 g (71,7 mmol) = 68 % d. Th.
R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 99:1 v/v):
^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,84-7,77 (m, 2H, H-2, H-6), 7,35-7,23 (m, 2H, H-4, H-5), 2,39 (d, 3H, Ph-CH_3, ^4J = 0,36 Hz), 1,60 (s, 9H, C(C**H**$_3$)$_3$).
^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 166,1 (C=O), 138,1 (C-3), 133,4 (C-4), 132,2 (C-1), 130,2 (C-2), 128,3 (C-5), 126,8 (C-6), 81,0 (**C**$(CH_3)_3$), 28,4 (C(**C**$H_3)_3$), 21,5 (Ph-CH_3).
$C_{12}H_{16}O_2$ (192,25)
FAB-MS (3-NBA): 193, 4 (M+H, 31).

3-(Bis-allyloxy-phosphorylmethyl)-benzoesäure-tert-butylester (65)

10 mg Dibenzoylperoxid werden zu einer Lösung von 3-Methylbenzoesäuretertbutylester und NBS (frisch aus Wasser umkristallisiert und über P_4O_{10} am HV getrocknet) in 40 ml CCl_4 gegeben und die Lösung zum Rückfluss erhitzt. Gleichzeitig wird mit einer 200 W Wolfram Lampe belichtet. Nach 3 h wird die Reaktion auf Raumtemperatur abgekühlt, filtriert und eingeengt. Längere Reaktionszeiten sind zu vermeiden (Dibromierung). Man erhält ein oranges Öl, Produkt: Edukt 7:2. Eine saubere Trennung von Edukt und Produkt ist nicht möglich, daher wird das Rohprodukt (3-Bromomethyl-benzoic acid tert-butyl ester) ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt. Zwei Äquivalente Triallylphosphit und 8,89 g (30,5 mmol) Brombenzoesäuretert-butylester werden ohne Lösungsmittel unter Argon auf 80

°C erhitzt. Nach 18 h wird überschüssiges Triallylphosphit im Vakuum abdestilliert und der Rückstand durch Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 7,28 g (20,66 mmol) = 67,7 % d. Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v): 0,34

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,68 (m, 2H, H-2, H-6), 7,28 (d, 1H, H-4, ^3J = 7,62 Hz), 7,14 (t, 1H, H-5, 7,62 Hz), 5,65 (d, 2H, CH_2-C**H**=CH_2, ^3J = 5,44 Hz, ^3J_Z = 10,92 Hz, ^3J_E = 16,61 Hz), 5,08 (ddd, 2H, CH_2-CH=C**H**$_2$, ^3J_E = 16,61 Hz, ^3J = 2,16 Hz, ^2J = 0,96 Hz), 4,95 (dd, 2H, CH_2-CH=C**H**$_2$, ^3J_Z = 10,92 Hz, ^2J = 0,96 Hz), 4,24 (m, 4H, C**H**$_2$-CH=CH_2,), 3,04(d, 2H, Ph-CH_2-P, $^3J_{H\text{-}P}$= 21,68 Hz)1,38 (s, 9H, C(C**H**$_3$)$_3$).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 165,1 (C=O), 136,3 (C-3), 133,5 (CH_2-**C**H=CH_2), 132,6 (Ph-**C**H_2-P), 132,0 (C-4), 131,3 (C-2), 130,5 (C-1), 128,2 (C-6), 127,8 (C-5), 117,7 (CH_2-CH=**C**H_2) , 80,8 (**C**(CH_3)$_3$), 66,3 (**C**H_2-CH=CH_2), 33,5 (d,$^1J_{C\text{-}P}$ = 137,41 Hz), 27,9 (C(**C**H_3)$_3$).

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,5 MHz): δ = 27,44.

$C_{18}H_{25}O_5P$ (352,36)

FAB-MS (3-NBA): 353,5 (M+H, 8), 352,4 (M+, 3).

HRMS (FAB, 3-NBA): berechnet 352,1440 gefunden 352,1463

3-(Bis-allyloxy-phosphorylmethyl)-benzoesäure (66)

7,28 g (20,7 mmol) des vorgereinigten tert-Butylesters werden in 40 ml abs. Methylenchlorid gelöst und mit 1,2 ml (100 mmol) Triethylsilan versetzt. Man gibt innerhalb von 5 min bei 0°C 20 ml TFA hinzu und rührt 1 h bei Raumtemperatur. Die Reaktionslösung wird mit Toluol verdünnt und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mit einem Gradient von Methylenchlorid/Methanol (2% Methanol bis 5% Methanol) chromatographiert. Man erhält 4,08 g eines orange farbenen Öls.

Ausbeute: 4,08 g (13,8 mmol) = 66,8 % d. Th.

R_f-Wert (Methylenchlorid/Methanol 19:1 v/v): 0,29

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 8,01 (br s, 1H, H-6), 7,98-7,93 (m, 1H, H-2), 7,52 (d, 1H, H-4, ^3J = 15,16 Hz), 7,37 (t, 1H, H-5, ^3J = 15,16 Hz), 5,74-5,94 (m, 2H, CH_2-C**H**=CH_2), 5,31 (d, 2H, Ph-C**H**$_2$-P, $^3J_{H\text{-}P}$ = 28,32 Hz), 5,20 (m, 2H, CH_2-CH=C**H**$_2$), 4,46 (m, 4H, C**H**$_2$-CH=CH_2).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 169,7 (C=O), 134,6, 134,5 (CH_2=**C**H-CH_2), 132,4 (C-3), 131,4 (C-4), 131,2 (C-1), 130,5 (C-2), 128,8 (C-5), 128,6 (C-6), 118,3 (**C**H_2=CH-CH_2), 67,1 (**C**(CH_3)$_3$), 66,9 (CH_2=CH-**C**H_2), 34,8 (Ph-**C**H_2-P), 32,0 (C(**C**H_3)$_3$).

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,5 MHz): δ = 28,08.

$C_{14}H_{17}O_5P$ (296,26)

FAB-MS (3-NBA): 319,0 (M+Na-H, 82) 297,0 (M+H, 100).

HRMS (FAB, 3-NBA): berechnet für $C_{14}H_{18}O_5P$: 297,0892 gefunden: 297,0899.

2-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-ethanol (71a)

6,08 ml Ethylenglykol werden langsam und unter Eiskühlung zu einer Suspension von 4,0 g (100 mmol) NaH in 150 ml abs. THF addiert. Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur wird unter Kühlung TBDMSCl (13,7 g, 91 mmol, 1 eq) gegeben und 1h bei Raumtemperatur gerührt. Man verdünnt die Reaktionsmischung mit Ethylacetat und gießt in eine ges. Lösung $NaHCO_3$. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Durch Destillation bei 2,4 mbar erhält man bei 53-58 °C das Produkt als farbloses Öl.

Ausbeute: 12,1 g (68,6 mmol) 76 %

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 7:1 v/v): 0,26

^{1}H-NMR (CDCl3, 400 MHz): δ = 3.98 (t, 2H, **H**-1), 3.72 (t, 2H, **H**-2), 1.0 (s, 9H, tButyl-C**H**$_3$), 0.08 (s, 6H, Si-C**H**$_3$).

^{13}C-NMR (CDCl3, 100,6 MHz): δ = 69,9 (**C**-2), 68,7 (**C**-1), 22,5 (^{t}Butyl-**C**H$_3$), 15,3 (^{t}Butyl-**C**), -0,8 (Si-**C**H$_3$).

$C_8H_{20}O_2Si$ (176,33)

2-Benzyloxy-ethanol (71)

Zu einer Suspension von 2,90 g NaH in 200 ml abs. THF werden langsam 7,36 ml Ethylenglykol addiert. Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur wird Benzylchlorid (7,6 ml, 8,36g, 1 Äquivalent) und eine katalytische Menge TBAI zugegeben und zum Rückfluss erhitzt. Nach 15 h wird auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Ethylacetat verdünnt. Nach Extraktion mit $NaHCO_3$ und Wasser wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Rohprodukt chromatographisch gereinigt. (Cyclohexan/Ethylacetat 70:30)

Ausbeute: 6,74 g (67%)

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v): 0,38

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,40-7,25 (m, 5H, Phenyl), 4,56 (s, 2H, Ph-CH$_2$), 3,75(t, 2H, CH$_2$-C**H**$_2$-OH, ^{3}J = 4,30 Hz), 3,59 (m, 2H, C**H**$_2$-CH$_2$-OH, ^{3}J = 4,30 Hz).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 138,2 (C-1), 128,6 (C-3, C-5), 128,0 (C-2, C-4, C-6), 73,5 (Ph-**C**H$_2$-O), 71,7 (CH$_2$-C**H**$_2$-OH), 62,1 (C**H**$_2$-**C**H$_2$-OH).

$C_9H_{12}O_2$ (152,1904)

FAB-MS (3-NBA): 153,3 (M+H, 2), 175,19 (M+Na, 6).

HRMS (FAB, 3-NBA): berechnet für $C_9H_{12}NaO_2$: 175,1802 gefunden: 175,1789.

(2-Benzyloxy-ethoxy)-essigsäure-tert-butyl ester (72)

Zu einer Lösung von 0,74 ml (976 mg, 5 mmol) Bromessigsäure-tert-butylester, 760 mg (5 mmol) Benzyloxyethanol und einer katalytischen Menge Tetrabutylammoniumbromid in 20 ml Dichlormethan werden 20 ml einer 30 %igen wässrigen KOH Lösung gegeben und 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit Dichlormethan verdünnt und die organische Phase mit $NaHCO_3$ und ges. NaCl Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Flash-Chromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat 9:1) erhält man 680 mg eines farblosen Öls.

Ausbeute: 680 mg (2,55 mmol) = 51 % d. Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 9:1 v/v): 0,27

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,36-7,32 (m, 4H, H-2, H-3, H-5, H-6), 7,32-7,24 (m, 1H, H-4), 4,57 (s, 2H, Ph-C**H**$_2$-O), 4,03 (s, 2H, O-C**H**$_2$-CO$_2$R), 3,73 (dd, 2H, Ph-CH$_2$-O-C**H**$_2$-CH$_2$, ^{3}J = 4,11 Hz, ^{3}J = 2,73 Hz), 3,66 (dd, 2H, Ph-CH$_2$-O-CH$_2$-C**H**$_2$, ^{3}J= 4,11 Hz, ^{3}J = 2,73 Hz), 1,47 (s, 9H, C(CH$_3$)$_3$).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 169,9 (C=O, Ester), 138,4 (C-1), 128,6 (C-3, C-5), 127,9 (C-2, C-4, C-6), 81,7 (Ph-**C**H$_2$-O), 73,5 (**C**(CH$_3$)$_3$), 70,9 (Ph-CH$_2$-O-**C**H$_2$-CH$_2$), 69,3 (Ph-CH$_2$-O-CH$_2$-**C**H$_2$), 28,3 (C(**C**H$_3$)$_3$).

$C_{15}H_{22}O_4$ (266,3328)

FAB-MS (3-NBA): 289,1 (M+Na, 100), 267,1 (M+H, 15), 211,0 (M-C(CH$_3$)$_3$, 68).

HRMS (FAB, 3-NBA): berechnet für $C_{15}H_{23}O_4$: 267,1596 gefunden: 267,1604
berechnet für $C_{15}H_{22}NaO_4$: 289,1416 gefunden: 289,1406

(2-Hydroxy-ethoxy)-essigsäure-tert-butylester (73)

383 mg (1,44 mmol) 2-Benzyloxy-ethoxy-essigsäure-tert-butylester werden in 10 ml Methanol gelöst und mit 50 mg 10%igem Pd/C (Degussa) unter H_2 versetzt. Man rührt 18 h bei Raumtemperatur. Der Reaktionsfortschritt wird mittels Dünnschichtchromatographie überwacht. Die Suspension wird über Celite filtriert und eingeengt. Man erhält ein farbloses Öl.

Ausbeute: 229 mg (1,3 mmol) = 91% d. Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v): 0,22.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 4.0 (s, 2H, O-C**H**$_2$-CO$_2$R), 3,72 (m, 2H, HO-C**H**$_2$-CH$_2$), 3,65 (m, 2H, HO-CH$_2$-C**H**$_2$), 2,99 (s, 1H, O**H**), 1,47 (s, 9H, C(C**H**$_3$)$_3$).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 170,6 (C=O, Ester), 82,3 (O-**C**H$_2$-CO$_2$R), 73,7 (**C**(CH$_3$)$_3$), 69,0 (HO-CH$_2$-**C**H$_2$), 61,8 (HO-**C**H$_2$-CH$_2$), 28,3 (C(**C**H$_3$)$_3$).

$C_8H_{16}O_4$ (176,2102)

FAB-MS (3-NBA): 199,0 (M+Na, 100), 177,1 (M+H, 23), 176,1 (M+, 5).

HRMS (FAB, 3-NBA): M+H: berechnet: 177,1127 gefunden: 177,1119
M+Na: berechnet: 199,0946 gefunden: 199,0959

{2-[Bis-(9H-fluoren-9-ylmethoxy)-phosphoryloxy]-ethoxy}-essigsäure-tert-butylester (74)

Zu einer Lösung von 626 mg (3,56 mmol) **73** und 498 mg (7,12 mmol) Tetrazol in Acetonitril/Dichlormethan (1:1, 40 ml) werden bei Raumtemperatur 2,04 g Phosphoramidit in 20 ml Dichlormethan gegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Das Verschwinden des Eduktes wird mittels TLC verfolgt. Das Produkt zersetzt sich auf dem TLC (Nachweis durch 2D-TLC) Nach 3h wird die Reaktion auf –30 °C abgekühlt und zwei Äquivalente (1,42 ml, 7,82 mmol) einer 5,5 M Lösung von tBuOOH in Decan zugegeben. Man erwärmt auf Raumtemperatur, verdünnt mit Ethylacetat, extrahiert mit 10% $NaHSO_3$, ges. NaCl Lösung und trocknet die organischen Phasen über Na_2SO_4. Nach dem Einengen und der Chromatographie des Rohproduktes (Cyclohexan/Ethylacetat 3:2, v/v) erhält man ein farbloses, sehr viskoses Öl.

Ausbeute: 1,86 g (3,04 mmol) = 84% d.Th.

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 3:2 v/v): 0,29.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,72 (t, 4H, C-4'', C-5'', ^3J = 7,44), 7,53 (dd, 4H, C-1'', C-8'', ^3J = 7,44 Hz, ^2J = 21,28 Hz), 7,37 (dt, 4H, C-3'', C-6'', ^3J = 7,44 Hz, ^3J = 21,28 Hz), 7,25 (m, 4H, C-2'', C-7''), 4,29 (t, 4H, H-1', ^3J = 6,45 Hz), 4,16 (t, 2H, P-O-CH_2-C**H**$_2$, ^3J = 6,64 Hz), 4,08 (m, 2H, P-O-C**H**$_2$-CH_2), 3,90 (s, 2H, O-C**H**$_2$-CO_2R), 3,65 (t, 2H, H-9'', ^3J = 6,45 Hz), 1,44 (s, 9H, $C(CH_3)_3$).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 169,5 (C=O), 143,5 (C-8a'', C-9a''), 141,6 (C-4a'', C-4b''), 128,1 (C-1'', C-8''), 127,3 (C-2'', C-4''), 125,4 (C-5'', C-7''), 120,2 (C-3'', C-6''), 81,9 (**C**$(CH_3)_3$), 70,3 (d, C-1', $^2J_{C-P}$ = 6,92 Hz), 69,5, (d, C**H**$_2$-CH_2-O-P, $^3J_{C-P}$ = 6,51 Hz), 69,0 (O-**C**H_2-CO_2R), 67,0 (d, CH_2-C**H**$_2$-O-P, $^2J_{C-P}$ = 6,15 Hz), 48,2 (d, C-9'', $^3J_{C-P}$ = 7,69 Hz), 28,3 (C(**C**H_3)$_3$).

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,5 MHz): δ = -0,47.

$C_{36}H_{37}O_7P$ (612,6485)

FAB-MS (3-NBA): 613,4 (M+H, 12).

HRMS (FAB, 3-NBA): berechnet für $C_{36}H_{38}O_7P$: 613,6565 gefunden 613,6582.

{2-[Bis-(9H-fluoren-9-ylmethoxy)-phosphoryloxy]-ethoxy}-essigsäure (75)

Zu einer Lösung von 706 mg (1,14 mmol) **74** in 20 ml abs. Dichlormethan und 0,4 ml Triethylsilan werden bei Raumtemperatur unter Argon 20 ml TFA gegeben. Nach 2 h ist laut TLC das Edukt quantitativ umgesetzt. Man verdünnt mit 30 ml Toluol und entfernt die flüchtigen Bestandteile im Vakuum. Das Rohprodukt wird mit Dichlormethan/Methanol (95:5) an Kieselgel chromatographiert. Man erhält einen farblosen Feststoff.

Ausbeute: 584,4 mg (1,05 mmol) = 92 % d.Th.

Smp.: 68-69 °C

R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 95:5 v/v): 0,19.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,70 (t, 4H, H-4'', H-5'', ^3J = 8,21 Hz), 7,49 (dd, 4H, H-1'', H-8'', ^4J = 7,43 Hz, ^3J = 6,43 Hz), 7,36 (dd, 4H, H-3'', H-6'', ^3J = 8,21 Hz, ^3J = 12,79 Hz), 7,26 (ddd, 4H, C-2'', C-7'', ^4J = 0,98 Hz, ^3J = 7,43 Hz, ^3J = 12,71 Hz), 4,27 (ddd, 4H, H-1', $^3J_{H-P}$ = 2,74 Hz, ^3J = 6,45 Hz, ^2J = 12,90 Hz), 4,10 (t, 2H, H-9'', ^3J = 6,45 Hz), 4,03 (s, 2H, O-C**H**$_2$-CO_2R), 4,02-3,96 (m, 2H, P-O-C**H**$_2$-CH_2), 3,59 (t, 2H, P-O-CH_2-C**H**$_2$, ^3J = 4,30 Hz).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 172,1 (C=O), 143,1 (C-8a'', C-9a''), 141,6 (C-4a'', C-4b''), 128,1 (C-1'', C-8''), 127,4 (C-2'', C-7''), 125,3 (C-3'', C-6''), 120,2 (C-4'', C-5''), 70,5 (d, C-1', $^2J_{C-P}$ = 3,84 Hz), 69,8 (d, **C**H_2-CH_2-O-P, ^3J = 5,38 Hz), 68,8 (O-CH_2-CO_2R), 67,2 (d, CH_2-**C**H_2-O-P, $^3J_{C-P}$ = 6,15 Hz), 48,0 (d, C-9'', $^3J_{C-P}$ = 8,46 Hz).

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,5 MHz): δ = -0,67.

$C_{32}H_{29}O_7P$ (556,5422)

FAB-MS (3-NBA): 579,0 (M+Na, 39), 557,0 (M+H, 8).

HRMS (FAB, 3-NBA): berechnet für $C_{32}H_{29}NaO_7P$: 579,1549 gefunden: 579,1554

2-[Bis-(9H-fluoren-9-ylmethoxy)-phosphoryloxy]-ethoxy-glycinylphenylalaninmethyl-ester (76)

80 mg (0,14 mmol) Säure werden mit 52,6 mg (0,138 mmol) HBTU und 72 ul (0,413 mmol) DIPEA in 1,5 ml Dichlormethan:DMF 2:1 bei Raumtemperatur 3 Minuten voraktiviert und anschließend mit 27,8 mg Phenylalaninmethylester-hydrochlorid versetzt. Man rührt 3,5h bei Raumtemperatur und verdünnt dann mit Ethylacetat. Nach Waschen mit 1N HCl, ges. $NaHCO_3$, H_2O, ges. NaCl und Trocknen über Na_2SO_4 engt man die organische Phase ein und erhält ein farbloses Öl. Das Produkt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 78,3 mg, 84% d. Th.-

R_f-Wert (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v): 0,28.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,80 (ddd, 4H, H-4'', H-5'', ^5J = 0,78 Hz, ^4J = 1,56 Hz, ^3J = 7,43 Hz), 7,48-7,58 (ddd, 4H, H-1'', H-8'', ^5J = 0,78 Hz, ^4J = 7,6 Hz, ^3J = 13,0 Hz), 7,39 (m, 4H, C-3'', C-6'',), 7,37 (d, 1H, Phe H-4, ^3J = 7,43 Hz), 7, 31 (ddd, 4H, C-2'', C-7'', ^3J = 7,43 Hz), 7,26-7,20 (m, 2H, Phe H-3, Phe H-5), 7,20-7,15 (m, 2H, Phe H-2, Phe H-6), 4,64 (dd, 1H, Phe-α-C**H**, ^3J = 5,67 Hz, ^3J = 8,21 Hz), 4,29 (m, 4H, H-1'), 4,13 (dd, 2H, CH_2-C**H**$_2$-O-P , ^3J = 5,56 ^2J = 13,29 Hz), 3,80 (s, 2H, O-C**H**$_2$-CONH), 3,81-3,86 (m, 4H, H-9''), 3,63 (s, 3H, OMe), 3,38-3,50 (m, 2H, C**H**$_2$-CH_2-O-P), 3,12 (dd, 1H, Phe-β-C**H**$_2$, ^3J = 5,67 Hz, ^2J = 13,71 Hz), 2,99 (dd, 1H, Phe-β-C**H**$_2$, ^3J = 8,21 Hz, ^2J = 13,71 Hz,),

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 172,2 (Ester C=O), 169,5 (Amid C=O), 145,0 (C-8a'', C-9a''), 143,0 (Phe-C-1), 130,7 (C-4a'', C-4b''), 129,9 (C-1'', C-8''), 129,3 (C-4'', C-5''), 128,7 (Phe-C-2, Phe-C-6), 128,3 (C-2'', C-7''), 126,5 (Phe-C-3, Phe-C-5), 121,5 (C-3'', C-6''), 118,8 (Phe-C-4), 71,5 (d, C-1', $^2J_{C\text{-}P}$ = 5,38 Hz), 70,0 (d, CH_2-CH_2-O-P, $^3J_{C\text{-}P}$ = 6,51 Hz), 68,1 (d, CH_2-CH_2-O-P, $^2J_{C\text{-}P}$ = 6,15 Hz), 54,6 (Phe-α-**C**H), 53,3 (O**C**H_3), 49,2 (d, C-9'', $^3J_{C\text{-}P}$ = 7,69 Hz), 38,4 (Phe-β-**C**H_2).

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,5 MHz): δ = -0,66.

$C_{42}H_{40}NO_8P$ (717,7427)

3-Phosphonomethyl-tyrosinyl-histidinyl-alanyl-glycin (67)

Tentagel S NH_2, versehen mit einem Wang Linker wird mit Fmoc-Glycin gemäß AAV-1 beladen. Fmoc-Alanin, Fmoc-Histidin(Trt), Fmoc Tyrosin und der Spacer X werden nacheinander gemäß AAV-1 bis AAV-4 aufgekuppelt. Anschließend wird das Harz in DMF suspendiert, entgast und mit $Pd(PPh_3)_4$ und Morpholin versetzt. Nach 4 h bei Raumtemperatur werden Palladiumrest mit einer Lösung von KCN in DMSO entfernt und das Harz dreimal mit 4 ml DMF und dreimal mit 4 ml Dichlormethan gewaschen. Gemäß AAV-7 wird das Peptid vom Harz abgespalten und mittels HPLC analysiert und gereinigt. (AAV-8 Methode A, AAV-9 Methode A).

Ausbeute: 15 mg (23 µmol)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 8,55-8,43 (m, 2H, H-2, H-6), 8,30-8,22 (m, 1H, His ε-H), 8,18-8,09 (m, 1H, H-5), 7,63-7,55 (m, 1H, H-4), 7,35 (m, 1H, His δ-H), 7,09 (d, 2H, Tyr H-2, H-6, ^3J = 8,41 Hz), 6,61 (d, 2H, Tyr H-3, H-5, ^3J = 8,41 Hz), 4,68-4,58 (m, 1H, Tyr α-H), 4,55-4,48 (m, 1H, His α-H), 4,35-4,25 (m, 1H, Ala α-H), 3,91-3,78 (m, 2H, Gly CH_2), 3,19-2,80, (br m, 4H, Tyr β-H, His β-H), 2,49 (br s, 2H, Ph-C**H**$_2$-P) 1,21 (d, 3H, Ala CH_3, ^3J = 7,04 Hz).

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,5 MHz): δ = 21,81.

$C_{29}H_{35}N_6O_{10}P$ (658,60)

ESI-MS:659,8 (M+H)

3-Phosphonomethyl-serinyl-phenylalanyl-leucyl-glycin(68)

Die Synthese erfolgt analog zur Synthese von X. HPLC Analytik folgt AAV-8, Methode A. Nebenprodukte werden gemäß AAV-9, Methode A abgetrennt.

Ausbeute: 12 mg (0,18 mmol)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,75 (br s, 1H, H-6), 7,72-7,67 (m, 1H, H-2), 7,53-7,42 (m, 2H, H-4, H-5), 7,35-7,18 (br m, 5H, Phe), 4,68 (dd, 1H, Phe α-H, ^3J = 5,47 Hz, ^3J = 7,43 Hz), 4,62 (t, 1H, Ser α-H, 3J = 5,74 Hz), 4,50 (dd, 1H, Leu α-H, ^3J = 4,69 Hz, ^3J = 10,36 Hz), 3,95 (m, 4H, Gly CH_2, Ser β-H), 3,77 (s, 2H, Ph-C**H**$_2$-P), 3,45-3,40 (m, 2H, Phe β-H), 1,80-1,70 (m, 1H, Leu C**H**$(CH_3)_2$), 1,68-1,54 (m, 2H, Leu β-H), 0,89 (d, 6H, Leu CH(C**H**$_3$)$_2$, ^3J = 6,45 Hz).

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,5 MHz): δ = 28,72.

$C_{29}H_{39}N_4O_{10}P$ (634,61)

ESI-MS: 635,7 (M+H)

3-Phosphonomethyl-methionyl-alanyl-prolyl-glycin (69)

Die Synthese erfolgt analog zur Synthese von X. HPLC Analytik folgt AAV-8, Methode A. Nebenprodukte werden gemäß AAV-9, Methode A abgetrennt.

Ausbeute: 10 mg (0,17 mmol)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 8,40-8,35 (m, 1H, H-6), 8,23-8,18 (m, 1H, H-2), 7,84-7,72 (m, 1H, H-5), 7,46-7,39 (m, 1H, H-4), 4,55-4,48 (m, 1H, Ala αH), 4,30-4,26 (m, 1H, Met αH), 3,85-3,75 (m, 1H, Pro αH), 3,71-3,65 (m, 2H, Gly CH_2), Pro δ-H Met γ-H), 2,10 (s, 2H, Ph-CH_2-P), 2,05-1,78 (br m, 7H, Met CH_3, Pro γ-H, Pro β-H), 1,19 (d, 3H, Ala CH_3, ^3J = 6,84 Hz).

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,5 MHz): δ = 22,55.

$C_{24}H_{35}N_4O_9PS$ (586,60)

ESI-MS: 587,7 (M+H)

Guanosin-5'-[β-imidazolium]-diphosphat (29)

Guanosin-5'-diphosphat Dinatrium Salz wird durch folgende Schritte in das Tris-tetrabutylammonium Salz überführt: 1,0 g (2,05 mmol) Guanosin-5'-diphosphat Dinatrium Salz werden in 200 ml Millipore®. H_2O gelöst und mit 5 g Dowex 50WX2-100 Ionentauscher versetzt. Nach 5 h Schütteln wird der Ionentauscher abfiltiert und zum Filtrat 1,60 g (6,16 mmol) Tetrabutylammoniumhydroxid (6,16 ml einer 1M Fluka-Standardlösung) gegeben. Man rührt 1h bei Raumtemperatur und entfernt das Wasser durch Gefriertrocknung. Zu einer Lösung von 40 mg GDP (0,5 mmol) in 1 ml abs. DMF werden unter Argon 42,3 mg Carbonyldiimidazol (2,5 mmol) gegeben und 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges CDI wird mit 10 Äquivalenten Methanol (0,2 ml) entfernt. Nach 45 min Rühren bei Raumtemperatur werden die flüchtigen Bestandteile im Hochvakuum entfernt, die Lösung auf 0,5 ml Gesamtvolumen eingeengt und direkt zum zu kuppelnden Phosphat gegeben.

Ausbeute: 2,03 g(1,76 mmol) = 86 % d.Th.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 8,18 (s, 1H, H-8), 6,01 (br s, 1H, H-1'), 4,95-4,78 (m, 2H, H-4', H-3'), 4,55-4,23 (m, 3H, H-5', H-2'), 3,10 (m, 24H, N-C**H**$_2$-CH_2-CH_2-CH_3), 1,80 (br s, 24 H, N-CH_2-C**H**$_2$-CH_2-CH_3), 1,52 (br s, 24H, N-CH_2-CH_2-C**H**$_2$-CH_3)1,07 (br s, 36 H, N-CH_2-CH_2-CH_2-C**H**$_3$).

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,5 MHz):δ = -8,5 (d, 1 P, β-P, $^3J_{P-P}$ = 17,84 Hz), -9,8 (d, 1 P, α-P, $^3J_{P-P}$ = 17,84 Hz).

$C_{58}H_{120}N_8O_{10}P_2$ (1151,5688)

GTP-Spacer(36)-TLFNG-OH[4]

702 mg Tentagel S-NH_2 Harz (Novabiochem, Beladung 1,13 mmol/g, 0,81 mmol NH_2-Gruppen) wird in 10 ml abs. Dichlormethan suspendiert. 423 mg (1,06 mmol) des Allyllinkers **87** werden in 5 ml abs. DMF gelöst und mit 396 mg (1,04 mmol) HBTU und 2,37 ml (2,12 mmol) DIEA versetzt. Nach 2 Minuten Voraktivierung wird diese Lösung zu der Suspension von Tentagel in 5 ml Dichlormethan gegeben und 11 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Beladung beträgt gemäß AAV-4 0,63 mmol/g. Gemäß AAV-1 wurden mit HBTU und DIEA die Aminosäuren Asparagin-Trt (N), Phenylalanin (F), Leucin (L) und Threonin-OtBu-OH (T) und der Spacer {2-[Bis-(9H-fluoren-9-ylmethoxy)-phosphoryloxy]-ethoxy}-essigsäure an das Harz gekuppelt. Die Beladung nach der letzten Kupplung entspricht 0,34 mmol/g = 94 % Ausbeute pro Kupplung (Durchschnitt). Nach dem Entschützen der Seitenketten mit TFA/Dichlormethan/TIPS (75/20/5) und Entfernen der Fluorenylmethylester gemäß AAV-4 wird das Harz mehrfach mit abs. DMF gewaschen und 8 h über frisch aktiviertem Molsieb (4Å) in abs. DMF geschüttelt. Zu einem Drittel dieser Mischung wird die Lösung des aktivierten GDP in DMF gegeben und 14h auf 50 °C erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wird mittels Gel-Phasen ^{31}P-NMR kontrolliert. Das Harz wird 4 mal mit je 10 ml abs. DMF gewaschen und erneut in 5 ml abs. DMF suspendiert und entgast die Suspension für 30 min durch Durchleiten eines Argonstroms. Man gibt 36 mg (0,03 mmol, 20 mol%) $Pd(PPh_3)_4$ sowie 175 µl (1,6 mmol) N-Methylanilin hinzu und schüttelt bei Raumtemperatur 14 h. Das Harz wird abfiltriert und 3 mal mit 3 ml abs. DMF gewaschen. Das DMF wird im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand mit 3 ml abs. Diethylether versetzt. Der weiße Niederschlag wird gemäß AAV-9 gereinigt.

Ausbeute: 46 mg (0,037 mmol) = 61 % d.Th.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,98 (s, 1H, H-8), 7,24-7,08 (m, 9H, Phe, C-2'', C-4'', C-5'', C-6''), 5,81 (d, 1H, H-1', ^3J = 6,19 Hz), 4,58 (t, 1H, Phe-α-H, ^3J = 9,54 Hz), 4, 67-4,62 (m, 1H, Thr-α-H), 4,55 (t, 1H, Gln-α-H, ^3J = 4,52 Hz), 4,45 (dd, 1 H, Leu-α-H, ^3J = 5,02 Hz, ^3J = 3,18 Hz), 4,26 (m, 1H, Thr-β-H), 4,20 (m, 2 H, Gly-α-H), 4,16-4,12 (m, 2H, H-4', H-2'), 4,05-3,99 (m, 2 H, H-5', H-3'), 3,64 (d, 2H, Ph-C**H**$_2$-P, $^2J_{H\text{-}P}$ = 17,41 Hz), 3,61 (m, 2H, Gln-β-

---

[4] Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Peptidsequenzen für die Validierung des Synthesekonzeptes synthetisiert. Aus Zeitgründen wurden diese Peptide jedoch im Rahmen der engen Kooperation von Herrn Dr. Courtney Aldrich mit GDP gekuppelt und charakterisiert. Die spektroskopischen Daten entsprechen den Erwartungen und sind im Laborjournal von Dr. Courtney Aldrich verzeichnet.

H), 3,12 (dd, 2H, Phe-β-H, ^2J = 14,05 Hz, ^3J = 5,35 Hz), 2,85 (dd, 2H, Leu-γ-H, ^3J = 13,88 Hz, ^3J = 9,37 Hz), 1,21-1,08 (m, 9H, Val-C**H**$_3$, Thr-C**H**$_3$).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100,6 MHz): δ = 176,6 (Gly C=O), 174,9 (Phe C=O), 172,9 (C-1), 172,8 (Gln C=O, Leu C=O, Thr C=O), 159,3 (P-CH_2-Ph-**C**O-NH-R), 154,3 (C-3), 152,2 (C-8), 138,0 (Phe-C-1), 136,9 (P-CH_2-**C-1**), 129,5 (C-2), 129,0 (C-5), 127,4 (Phe-C-2, C-6), 126,7 (Phe-C-3, C-4, C-5), 74,0 (C-1'), 71,2 (C-2'), 70,8 (C-4'), 69,7 (C-3'), 65,7 (C-5'), 55,0 (Leu α-C), 49,7 (Gly-α-C), 43,7 (Leu-**C**H), 37,3 (Leu-CH_3), 16,6 (Thr-**C**H_3).

^{31}P-NMR ($CDCl_3$, 202,5 MHz): δ = 8,16 (1P, γ-P), -11,15 (1P, α-P), -23,17 (1P, β-P).

$C_{40}H_{60}N_{11}O_{24}P_3$ (1171,89)

PEGA-Spacer(37)-GTP (77b)

Für die Entwicklung eines Fluoreszenz-Assays ist eine GTP beladenes Harz notwendig. Hierzu wird gemäß AAV-1 der Fluorenylphosphat Spacer **75** an PEGA Harz gekuppelt und die Phosphatschutzgruppen gemäß AAV-4 mit Piperidin entfernt. Anschließend wird, wie bereits beschrieben, voraktiviertes GDP zum Harz gegeben und 14 h bei 50 °C geschüttelt. In analoger Weise können ADP und XDP auf das Harz gekuppelt werden.

^{31}P-NMR (DMSO/DMF/Dichlormethan, 202,5 MHz, on-bead): δ = -10,28 (2P, α-P, γ-P), -21,23 (1 P, β-P).

2[Bis-(9H-fluoren-9-ylmethoxy)-phosphoryloxy]-ethoxy-alanyl-phenylalanyl-glycin(77a)

PEGA-Harz, wird mit dem Allyllinker **87** gemäß AAV-1 beladen. Fmoc-Alanin, Fmoc-Phenylalanin, Fmoc-Glycin sowie der Spacer **75** werden gemäß AAV-1 bis AAV-4 aufgekuppelt. Der Spacer wird gemäß AAV-4 entschützt und das Harz in abs. DMF über Molsieb suspendiert. Man gibt 4 Äquivalente voraktiviertes GDP hinzu und schüttelt 14 h bei 50 °C. Nach dreimaligem Waschen mit DMF wird das Harz anschließend in DMF suspendiert, entgast und mit $Pd(PPh_3)_4$ und Morpholin versetzt. Das Harz wird abfiltriert und 3 mal mit 3 ml abs. DMF gewaschen. Das DMF wird im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand mit 3 ml abs. Diethylether versetzt. Der weiße Niederschlag wird gemäß AAV-9 gereinigt.

^{31}P-NMR (DMSO/DMF/Dichlormethan, 202,5 MHz): δ = -10,32 (d, 1P, α-P, ^3J = 18,79 Hz), -10,65 (d, 1P, γ-P, ^3J = 19,54 Hz), -22,4 (dd, 1P, β-P, ^3J = 18,79 Hz, ^3J = 19,54 Hz).

Synthese der Split-Mix-Bibliothek

Die Reproduzierbarkeit der Synthesen und die Funktionsfähigkeit der Beads im Fluoreszenz-Assay hängen entscheidend von der Integrität der Beads ab. PEGA Beads dürfen keinesfalls

rasch im Feinvakuum getrocknet werden. Zum Trocken ist entweder eine Suspension in Wasser mit anschließender Gefriertrocknung zu empfehlen oder ein sukzessives Waschen mit folgenden Mischungen: a) 100 % Dichlormethan b) 75 % Dichlormethan 25 % Diethylether c) 50% Dichlormethan 50 % Diethylether d) 25 % Dichlormethan 75 % Diethylether e) 100% Diethylether. Im Vergleich zu Polystyrol-Harzes ist die mechanische Stabilität verringert. Für die hier durchgeführte Synthese mit der Quest 210 ist eine langsame Agitation daher unabdingbar und folgendes, optimiertes Syntheseprotokoll, sehr zu empfehlen:

Von den eingesetzten Aminosäuren sowie von HBTU werden Maßlösungen hergestellt. Die Konzentration wird so gewählt, dass bei einem Einsatz von vier Äquivalente Aminosäure[5], und 3,97 Äquivalenten HBTU je 2 ml Aminosäurelösung und 1 ml HBTU Lösung pro Quest-Reaktor benötigt werden. Nach der Zugabe von sechs 6 Äquivalenten DIEA wird das Lösungsmittelvolumen auf 4ml mit DMF (Peptide Grade) aufgefüllt. Nach einer Kupplungszeit von 4 h und negativem Kaiser-Test wurde das Harz gewaschen. Sorgfältiges Waschen ist essentiell für gute Ausbeuten bei der GDP-Kupplung. Das automatische Waschprogramm der Quest ist folgendermaßen zu programmieren: 3 x 4 ml DMF (je 5 min), 2 x 4 ml Dichlormethan (je 5 min), 2 mal 4 ml THF 1 x 4 ml DMF (5 min). Anschließend wird sicherheitshalber ein Capping durchgeführt (10 Äquivalente Acetanhydrid in 3,5 ml Pyridin/Dichlormethan 1:1, Reaktionsdauer 5 min). Das Entschützen der Fmoc-Gruppen erfolgt mit 20 % Piperidin in DMF (2 mal 15 min). Die Beads aus allen Reaktoren werden anschließend in einen einzelnen Reaktor gefüllt und in 6 ml DMF suspendiert. Durch langsame Agitation werden die Beads 30 min durchmischt. Die Beads werden in einen 100 ml Rundkolben gespült und Dichlormethan und Methanol zugegeben bis das Lösungsmittelverhältnis DMF/Dichlormethan/Methanol 80:15:5 beträgt. Das in dieser Mischung suspendierte Harz wird mittels Eppendorf-Pipette aliquotiert und erneute gewaschen (s.o.). Auf diese Weise werden alle Aminosäuren und der Spacer aufgekuppelt. An die Kupplung des Spacers schließt sich eine Reaktionskontrolle mittels ^{31}P-NMR an, die nach Entschützen des Spacers wiederholt wird. Vor der Kupplung mit GDP werden alle Harzportionen in den Reaktoren dreimal mit abs. DMF gespült. Die Kupplung mit voraktiviertem GDP erfolgt bei 50 °C und langsamer Agitation. Nach 14 h Reaktionszeit wird die Reaktion durch ^{31}P-NMR kontrolliert. Nach einem letzten Waschen (s.o.) kann das Harz für das Screening eingesetzt werden.

[5] Der Einsatz von 10 Äquivalenten reduziert die Kupplungszeiten auf unter 1h, ist allerdings angesichts der damit verbundenen Kosten nicht empfehlenswert.

Labeln von H-Ras mit Atto-655

Eine Lösung von verkürztem H-Ras (Aminosäuren 1-166, 300 µl, 39,8 mg/ml H-Ras[6], 30 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 3 mM DTE) wird in einem Vivaspin® Filter (Durchlässig bis 5 kD) mit 4 ml Ascorbat-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM MgCl2, 1,2 mM Ascorbinsäure) versetzt und 30 min. bei 0°C und 2000 g zentrifugiert. Das Restvolumen von 50 µl wird erneut mit 4 ml Ascorbat-Puffer versetzt und 30 min. bei 0°C und 2000 g zentrifugiert. Die verbleibenden 50 µl werden mit Ascorbat-Puffer auf 100 µl verdünnt und die Proteinmenge mittels Bradford-Test bestimmt. Man erhält 21,4 mg/ml H-Ras. Die H-Ras Lösung wird mit 300 µl einer Lösung von Maleimido-Atto-655 (5 mg/ml) versetzt und 16 Stunden im Kühlschrank bei 4 °C zur Reaktion gebracht. Erneut wird mit einem Vivaspin® Filter der Puffer gewechselt. Das zweimalige Waschen erfolgt mit einem Tris-Puffer (30 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 3 mM DTE). Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgt erneut durch einen Bradford-Test. Man erhält 17,6 mg/ml Atto-655 gelabeltes H-Ras. Dieser Werte korreliert mit der UV Bestimmung (Atto-655 ε = 11000 bei 650 nm). Die Proteinlösung wird in 30 µl Portionen bei –78 °C gelagert.

Bradford-Lösung (100 ml):

50 mg/ml Coomassie Blue G, 25 ml Methanol, 42,5 ml H3PO4, 32,5 ml Millipore H_2O

[6] Hier wird eine Mutante von H-Ras verwendet, die in Position 39 ein Cystein trägt. Diese einzige freie Thiolgruppe auf der Oberfläche des Proteins reagiert mit dem Fluorophor.

Blocking Puffer 1:

30 mM Tris pH 7.5, 2 mM DTE, 1% w/v BSA (Sigma), 0,1 % w/v Tween-20.

Blocking Puffer 2:

30 mM Tris pH 7.5, 2 mM DTE, 1% w/v BSA (Sigma), 0,1 % w/v Tween-20, 5 mM $MgCl_2$

Inkubationspuffer:

10 µl einer 300 µM Ras-Atto-655 (UV, Bradford-Test) werden mit Blocking Puffer auf 3,0 ml verdünnt. Man gibt 300 µl einer 100 mM EDTA Lösung hinzu.

Durchführung des Assays:

Pro Eppendorf Safe-Lock® werden ca. 2 mg beladenes PEGA-Harz (DMF befeuchtet) eingewogen. Die Beads werden je 2 mal mit DMF, Dichlormethan und zuletzt THF gewaschen. Anschließend wird das THF durch dreifaches Waschen mit Blocking Puffer entfernt. Man inkubiert die Beads 2 h bei 4 °C im Blocking Puffer. Dieser wird sorgfältig entfernt und 30 µl Ras Inkubationspuffer zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 0 °C wird der Puffer entfernt und Blocking Puffer 2 zugegeben. Bei 0 °C können die Beads ohne Verlust von Fluoreszenz bis zu 4 Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

Screening am Konfokalen Laser Fluoreszenz Mikroskop

Für die erste Untersuchung der Bibliothek nach der Inkubation wird ein Laser-Rastermikroskop MRC 1024 der Firma BioRad, ausgerüstet mit drei Detektionskanälen (Photomultiplier), verwendet. Man pipettiert etwa 50 µl einer Suspension von Ras-inkubierten PEGA Beads auf einen Objektträger. Die Fluoreszenz wird mit der Emissionslinie 647 nm des Kr-Ar Lasers angeregt. Die Fluoreszenz wird bei 680 nm detektiert. Aufgrund der intensiven Fluoreszenz ist die Anregung mit maximal 3 % Laserpower zu empfehlen. Durch Verwendung des Kalman-Filters wird die Kontrastschärfe verbessert.

Screening und Bead Picking am Mikroinjektionsgerät „Axiovert 135 TV inverse Microscope“

Das Screening der Split-Mix Bibliothek wird nach Inkubation mit Atto-655 gelabeltem H-Ras an einem Axiovert 135 TV inversen Mikroskop der Firma Zeiss versehen mit einer Hitachi KP-140 Kamera durchgeführt. Als Lichtquelle dient eine Quecksilberhöchstdruck-Lampe der Firma Osram. Die charakteristischen Linien und das Grundkontinuum werden unterhalb einer Wellenlänge von 620 nm durch ein HQ-Cy5-Filterset der Firma AHF Analysentechnik,

Tübingen, bestehend aus einem Anregungsfilter HQ 620/60, einem Strahlenteiler Q660 LP und einem Sperrfilter HQ700/75 herausgefiltert, so dass im für Atto-655 relevanten Bereich keine störenden Einflüsse auftreten.[7] Hierzu entfernt man den Standard-Filter und -Reflektorschieber und setzt den F41-008 HQ-Cy-5 Filtersatz von AHF Analysetechnik ein. Der Mikromanipulator des Axiovert 135 TV wird über ein Gerät der Firma Zeiss gesteuert (AIS, Automated Injection System), das normalerweise vorbereitende Manipulationen für die Mikroinjektion vornimmt. Die 50 W Hg Höchstdrucklampe wird eingeschaltet, der Shutter bleibt zunächst geschlossen. Man pipettiert etwa 100 – 150 µl einer Suspension von Ras-inkubierten PEGA Beads auf eine kleine Petrischale und befestigt diese auf dem Mikroskoptisch. Der Rechner zur Steuerung des Mikromanipulators wird eingeschaltet und die Position des Mikroskoptisches kalibriert. Achtung: Der Mikromanipulator muss in der obersten Position sein, da der Rechner den Mikroskoptisch zunächst automatisch bewegt. Ein Hampton Research Cryo-Loop (100 µm Loop-Durchmesser, 5 µm Dicke) wird mit 2 cm Tesafilm umwickelt und in das Bohrfutter an der Spitze des Mikromanipulators eingespannt. Der Fokus wird im Durchsichtmodus eingestellt, anschließend wird die obere Lampe abgedeckt und der Shutter der Hg-Lampe geöffnet. Mittels Mausbewegung wird im „Move-Plate“ Menü die Petrischale bewegt bei gleichzeitiger visueller Kontrolle. Das Sichtfeld ist schwarz, fluoreszierende Beads werden als helle rote Punkte wahrgenommen. Die Abdeckung der oberen Lampe wird entfernt und die Schlinge zu dem als Hit identifizierten Bead maneuvriert. Im Menü „Adjust“ wird mittels Mausbewegung der Mikromanipulator unter ständiger visueller Kontrolle abgesenkt bis die Schlinge um den Bead herum liegt. Erneut wird in das „Move-Plate“ Menü gewechselt und der Bead in der Schlinge aus dem Ensemble herausgezogen bis in einen zuvor markierten Bereich auf der Petrischale, der frei von anderen Beads ist. Der auf diese Weise isolierte Bead wird mit 5 µl Blocking Puffer versetzt und mit einer Eppendorf Pipette aufgenommen. Die Beads werden in einem Eppendorf SafeLock® gesammelt und zur Sequenzierung vorbereitet (s.u.)[8]

Edman Sequenzierung

---

[7] Ein HQ-Cy5-Langpass-Filterset der Firma AHF Analysentechnik wurde ebenfalls getestet, die Resultat waren jedoch nicht besser.

[8] Ebenfalls getested wurde das Aufspießend der fluoreszierenden Beads mit einer Glaskapillare. Der Durchmesser der Spitze lag bei ca 1 µm. Die ausgezogenen Kapillaren wurden an einem semi-automatischen Puller der Firma Narishenge Scientific Instruments hergestellt. Die mechanische Instabililtät der Beads führte jedoch oft zur Zerstörung der Beads, so dass dem „Cryo-Loop“ Verfahren der Vorzug gegeben wurde.

Die durch manuelle Bead-Picking selektierten Beads wurden in einem Multisyntec-Reaktor gesammelt und je 2mal mit folgenden Lösungen für jeweils 30 min gewaschen: 6M Guanidiumchlorid, 1M Natriumdodecylsulfat, Wasser und DMF. Anschließend wurde 5 mal für jeweils 10 Minuten mit Dichlormethan gewaschen und anschließend die Boc-geschützten N-Termini abgespalten. Hierzu wurden die Beads 3 Stunden in TFA:Dichlormethan:iPr_3SiH im Verhältnis 95:2,5:2,5 geschüttelt. Kontrollen unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigten, dass kein Bead mehr fluoreszierte, d.h. das markierte Protein war entfernt. Ein Kaisertest an einem Bead belegte die Existenz freier Aminogruppen. Die Beads werden bei 4 °C in Wasser suspendiert und zur Sequenzierung mittels Edman-Abbau gebracht.

GOLD Docking

Die Input Datei für das Docking der GTP-Peptidkonjugate an G12V-Ras ist in Anhang VII wiedergegeben. Für das Docking wird GTP in der Bindungstasche in der Position fixiert, die es in den verschiedenen Kristallstrukturen übereinstimmen innehat. Peptid und Linker werden eingedockt. Hierbei wird der Ligand „kovalent“ mit GTP verbunden, d.h. für GOLD wird ein „covalent link“ zwischen dem Peptid, dem Linker und dem γ-Phosphat definiert. Da der kovalente Link nur jeweils für einen Liganden definiert werden kann, ist das Docking der verschiedenen Liganden sukzessive durchzuführen.

Parallelsynthese einer kleinen Bibliothek von Peptiden

Die Substanzbezeichnungen folgen dem erweiterten Ein-Buchstaben-Code wie er auf Seite X definiert wurde. Die Kupplungschritte erfolgen gemäß AAV-1, anschließend werden freie AMinogruppen mit Acetanhydrid gecapped (AAV-3). Das Entfernen der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppen erfolgt gemäß AAV-5. Zur Synthese wird zunächst 2 g Wang-PS-Harz (1,03 mmol/g, Advanced ChemTech) mit Fmoc-Glycin beladen. Nach Capping wird das Harz aufgeteilt. Die erste Hälfe wird mit Fmoc-Arginin-Pmc gekuppelt, die zweite mit Fmoc-Phenylalanin. Nach Capping werden beide Chargen erneut in gleiche Teile aufgeteilt und jeweils mit Fmoc-Tyrosin (tBu) bzw. Fmoc-Glutamin (Trt) gekuppelt. Nach erneuter Aufteilung wurden die Aminosäuren Glycin, Alanin Asparginsäure und Phenylalanin auf die Peptidkette gekuppelt. Nach Capping und Fmoc-Entschützung werden die Chargen ein letztes Mal aufgeteilt und mit den Kopfgruppen B, U, O, J und Z gekuppelt. Im Falle der J Kopfgruppe wird das Harz nach der Kupplung gewaschen und in DMF suspendiert. Die Allylschutzgruppen werden mit 10 mol% Pd und Morpholin als Allylfänger entfernt. Anschließend werden alle einzelnen Verbindungen gemäß AAV-6 von Harz abgespalten und

mittels HPLC-ESI analysiert. Die Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC. Die Substanzen wurden mittels HPLC-ESI charakterisiert.

BFFF

$C_{34}H_{35}N_5O_5$

Ausbeute: 12 mg (20 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 594,8 (M+H), berechnet: 593,67

$[\alpha]_D^{22}$: +12,4 ° (c = 1,1 in $CHCl_3$).

Retentionszeit (AAV-7B): 11,3 min.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,29-7,11 (br m, 16H, Phe, H-6), 6,88 (m, 1H, H-2), 6,61 (m, 1H, H-5), 5,01-4,73 (m, 3H, α-H), 3,22-3,11 (m, 6H, β-H).

OFFF

$C_{34}H_{34}N_4O_6$

Ausbeute: 19 mg (33 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 595,7 (M+H), berechnet: 594,66

$[\alpha]_D^{22}$: + 9,7 (c = 0,9 in $CHCl_3$).

Retentionszeit (AAV-7B): 12,5 min.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,27-7,03 (br m, 17H, Phe, H-6, H-2), 6,52 (m, 1H, H-5), 4,99-4,71 (m, 3H, α-H), 3,25-3,15 (m, 6H, β-H).

UFFF

$C_{34}H_{34}N_4O_6$

Ausbeute: 11 mg (20 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 595,8 (M+H), berechnet: 594,66

$[\alpha]_D^{22}$: +9,1 (c = 1,0 in $CHCl_3$).

Retentionszeit (AAV-7B): 12,5 min.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 7,33-7,12 (br m, 17H, Phe, H-6, H-2), 6,81 (m, 1H, H-5), 5,10-4,95 (m, 3H, α-H), 3,21-3,13 (m, 6H, β-H).

JADFG

$C_{25}H_{28}N_4O_{10}$

Ausbeute: 4 mg (7 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 545,7 (M+H), berechnet: 544,51

Retentionszeit (AAV-7A): 16,2 min.

JNDFG

$C_{26}H_{29}N_5O_{11}$

Ausbeute: 6 mg (8 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 588,8 (M+H), berechnet: 587,54

Retentionszeit (AAV-7A): 13,5 min.

JNYFG

$C_{31}H_{33}N_5O_{10}$

Ausbeute: 4 mg (4 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 636,7 (M+H), berechnet: 635,62

Retentionszeit (AAV-7B): 11,5 min.

JAYFG

$C_{30}H_{32}N_4O_9$

Ausbeute: 5 mg (8 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 593,8 (M+H), berechnet: 592,60

Retentionszeit (AAV-7A): 14,6 min.

BADFG

$C_{25}H_{30}N_6O_8$

Ausbeute: 7 mg (12 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 543,7 (M+H), berechnet: 542,54

Retentionszeit (AAV-7B): 10,4 min.

BAYFG

$C_{30}H_{34}N_6O_7$

Ausbeute: 3 mg (5 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 591,8 (M+H), berechnet: 590,63

Retentionszeit (AAV-7A): 16,5 min.

BNDFG

$C_{26}H_{31}N_7O_9$

Ausbeute: 8 mg (13 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 586,7 (M+H), berechnet: 585,57

Retentionszeit (AAV-7B): 9,4 min.

GFYNB

$C_{31}H_{35}N_7O_8$

Ausbeute: 12 mg (19 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 634,8 (M+H), berechnet: 633,65

Retentionszeit (AAV-7B): 11,7 min.

GFYNZ

$C_{30}H_{33}N_7O_8$

Ausbeute: 15 mg (24 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 620,7 (M+H), berechnet: 619,63

Retentionszeit (AAV-7A): 14,2 min.

GFYAZ

$C_{29}H_{32}N_6O_7$

Ausbeute: 8 mg (13 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 577,8 (M+H), berechnet: 576,60

Retentionszeit (AAV-7B): 10,8 min.

GFDNZ

$C_{25}H_{29}N_7O_9$

Ausbeute: 7 mg (12 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 572,6 (M+H), berechnet: 571,54

Retentionszeit (AAV-7A): 10,3 min.

GRQYZ

$C_{28}H_{38}N_{10}O_8$

Ausbeute: 3 mg (5 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 643,8 (M+H), berechnet: 642,66

Retentionszeit (AAV-7B): 8,5 min.

GFDAZ

$C_{24}H_{28}N_6O_8$

Ausbeute: 18 mg (34 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 529,7 (M+H), berechnet: 528,51

Retentionszeit (AAV-7A): 12,2 min.

GRQSZ

$C_{22}H_{34}N_{10}O_8$

Ausbeute: 2 mg (4 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 567,8 (M+H), berechnet: 566,57

Retentionszeit (AAV-7A): 6,3 min.

BGNRG

$C_{21}H_{32}N_{10}O_7$

Ausbeute: 9 mg (16 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 537,7 (M+H), berechnet: 536,54

Retentionszeit (AAV-7A): 7,5 min.

BANRG

$C_{22}H_{34}N_{10}O_7$

Ausbeute: 5 mg (9 µmol)

HPLC-MS (ESI): gefunden: 551,8 (M+H), berechnet: 550,57

Retentionszeit (AAV-7B): 7,1 min.

6.5 Arbeiten zum Kapitel 4.2

3D Strukturen von Nakijichinon C und den biologisch aktiven Analoga.

Beispiel Nakijichinon C

WitnotP:

Build fragment group keto get Naki_C done

Durch entsprechendes Markieren werden folgende Fragment, mit den jeweils vordefinierten Atomparametern, angefügt: Ethylene (3mal), Keto (1mal), Serine (1mal), C(sp3) (8mal), cyclohexan (chair) (1mal).

<:|"prca Naki_C" done

Unix:

Minall_run Naki_C done

WitnotP:

Delete –molecule Naki_C done
Read xpdb Naki_C_m.pdb done
Write xpdb NakijichinonC Naki_C done

Analog dazu wurden die Analoga gezeichnet und minimiert. Entscheidend für korrekte Ergebnisse ist die richtige Parametrisierung der Atome.

Erstellung der Alignments, Konstruktion der Homologiemodelle und Analyse

Die Koordinaten folgender Kristallstrukturen wurden der Protein Data Bank entnommen:

1) Fibroblast Growth Factor 1 Receptor (FGF1R): 1FGI und 2FGI

2) Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR-2): 1VR2

3) Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R): 1IR3

4) Insulin Receptor Kinase (IRK): 1IRK

Die Primärsequenzen im FASTA Format wurden mit dem Editor "jot" in eine Input Datei für DIALIGN kopiert. Diese ist in Anhang X gezeigt.

Unix:

dialign FGFhomol p a <Return>
dialign ERBhomol p a <Return>

Die so angeordneten Sequenzen wurden für MODELLER 4.0 in folgende Dateien (siehe CD) kopiert:

TIE2.ali
VEGFR2.ali
VEGFR3.ali
ERB.ali

Die Programmeingaben (Auswahl von Algorithmen etc.) für MODELLER wurden in folgenden Dateien zusammengefasst (siehe CD):

TIE2.top
VEGFR2.top
VEGFR3.top und
ERB.top

Damit konnten die Modelle berechnet werden (hier am Beispiel eines Tie-2 Modells beschrieben).

Unix:

```
mod4 Tie2 (bzw. Mod4 VEGFR2 etc.)
cp Tie2.B999999 Tie2_mod01.pdb
whatcheck Tie2_mod01.pdb
latex_old pdbout.tex
dvips –o Tie2_mod01_analyse.ps pdbout.dvi
ghostview Tie2_mod01_analyse.ps
```

In analoger Weise wurden die Modelle der anderen Kinasen erstellt und der WHATCHECK-Output mit „Ghostview“ visualisiert und analysiert. Verbesserungen wurden durch Veränderungen des Alignments erzielt. Die von WHATCHECK erstellten Ramachandran Plots sowie weitere wichtige Bewertungen sind in Anhang V und Anhang VI wiedergegeben. Die in Anhang VI aufgeführten Analysen waren bei der Konstruktion der Modelle anfänglich außerhalb der erwarteten Bereiche. Durch schrittweise Verbesserungen des Alignments und der Seitenketten konnten die Modelle verbessert werden.

Bindungsmodi der Kinaseinhibitoren:

Die vorminimierten Inhibitoren wurden gemäß AAV-MM10 in das aktive Zentrum der jeweiligen Kinasen gedockt. Die sonstigen Eingaben sind hier am Beispiel Nakijichinon und ErbB-2 exemplarisch dargestellt.

WitnotP:

```
Read xpdb erb_model09.pdb
Read xpdb NakiC.pdb
Move –molecule erb_model09.pdb erb done
Move –molecule NakiC.pdb INHB done
<:|”use INHB” (siehe AAV-MM10)
freeze INHB done
freeze erb done
```

move –molecule INHB erb done
<:|”pdb2c erb“ (siehe AAV-MM2)

Unix:

Minharmfix_run erb (siehe AAV-MM5)

Bei den von 1FGI abgeleiteten Modellen reicht ein Radius von 5 Å aus, so dass hier gemäß AAV-MM4 mit „minim_run model_x“ gearbeitet wurde. Vor den Minimierungen muss in jedem Fall eine Kontrolle der Parameter für Histidine und Lysine erfolgen. Ebenso ist die Protonierung von Asparaten und Glutamaten zu kontrollieren.

Berechnung der Volumina der hydrophoben Taschen

Zunächst werden die Proteinstrukturen auf mögliche Taschen untersucht und gemäß AAV-MM21 mit Wassermolekülen ausgefüllt. Als Begrenzung der hydrophoben Tasche wird eine Ebene definiert durch F1007-Cα, F1007-C, M1076-Cα und M1076-N verwendet. Die Angaben beziehen sich auf die 1IR3.pdb Strukur. Bei anderen Kinasen wurden die entsprechenden Atome verwendet. Alle PASS-Pseudo-Atome („Probe Spheres“) innerhalb der so definierten Begrenzung werden in WitnotP als separates Molekül definiert.

WitnotP:

Copy –atoms (Pseudo-Atome mit der Maus markieren) igf1r_pocket.
Set radii 1.4 igf1r_pocket –done
Modify atom type igf1r_pocket Osp3 –done
Modify hydrogens igf1r_pocket –done
Write xpdb igf1r_pocket igf1r_pocket –done

Anschließend kann das Volumen bzw. die Überlappung mit dem hydrophoben Teil eines Inhibitors gemäß AAV-MM12 durchgeführt werden.

6.6 Arbeiten zu Kapitel 4.3

Vorbereitung einer Farnesyltransferasestruktur für Molecular Modelling Arbeiten

Die Strukturdaten der Ratten-Farnesyltransferase wurden aufgrund der Verwendung dieses Enzyms im in vitro Assay für die Molecular Modelling Arbeiten ausgesucht. Aus der Protein Data Base stammen die Koordinaten für 1D8D und 1JCR, jeweils mit CAAX Peptid und FPP bzw. FPP Analogon sowie für 1FT1. Letztere Struktur enthält keine Liganden und diente als Referenz um Veränderungen des Enzyms bei Bindung von Liganden zu verstehen. Zur Vorbereitung der Strukturen sind folgende Arbeitsschritte in durchzuführen:

WitnotP:

Read xpdb 1d8d.pdb –done
Move –molecule 1d8d.pdb ftase –done
Move –atoms (Cystein “s” anklicken) –connected –done peptid –done
Move –atoms (FPP “P” anklicken) –connected –done fpp –done
<”| pdb2c ftase” (Zur Vorbereitung für eine Kraftfeldminimierung gemäß AAV-MM2)
Label type ftase done (Überprüfung der korrekten Parametrisierung der Atome)

Die Minimierung erfolgt von der Unix Kommandozeile gemäß AAV-MM9.

In WitnotP erfolg die weitere Bearbeitung:

WitnotP:

Delete molecule ftase pb2_save_ftase done
Read xpdb ftase_m.pdb done
Move –molecule ftase_m.pdb ftase done
Write xpdb ftase ftase done

Eine zusätzliche Minimierung gemäß AAV-MM8 verfeinert die Struktur ist aber bei der Verwendung für Docking Experimente nicht unbedingt nötig, da die betroffenen Atome bei einer Minimierung eines Protein-Liganden Komplexes gemäß AAV-MM5 ohnehin in die Optimierung einbezogen sind. Mit dieser Struktur können die Bindungsmodi von Farnesyltransferaseinhibitoren ermittelt werden. Hierfür recht nützlich ist eine Hydrophobizitätskarte die wie folgt zu erstellen ist:

WitnotP:

<:|”hydroprep ftase ”

Unix:

Move ftase_hyd.mol ftase_hyd.mol2 done
Hydromap ftase.inp done (siehe Anhang VII)

(GRASP Bild mit Snapshot und XV in TIFF Format konvertieren und abspeichern)

Abbildungen wie X etc. können mit der „ftase“ Struktur wie folgt erstellt werden:

WitnotP:

Define set ftase –rzone 4 peptid done peptidepocket done
Define set ftase –rzone 4 fpp –not set peptidepocket done fpppocket done
Define set ftase –rzone 12 fpp done proteinsurface done
<:|”sasurf peptidepocket” (siehe AAV-MM11)
<:|”sasurf fpppocket” (siehe AAV-MM11)
<:|”sasurf proteinsurface” (siehe AAV-MM11)

Anschließend können die Farben im Surface-Color Untermenü individuell verändert werden.

Es ist empfehlenswert für die Graphiken das Zinkion überproportional darzustellen:

WitnotP:

Move –atom (Zink anklicken) zn done
Cpk on zn done
Set radii zn 1.0 done

<“| cast Inhibitor“ (Führt zur einer anschaulicheren Dargestellung der gedockten Inhibitoren)

Anschließend kann der Screenshot mit „Snapshot“ und „XV“ als TIFF Format abgespeichert werden. **Anmerkung** (gilt auch für alle folgenden Minimierungen von PFT/Liganden Komplexen): Probleme mit der Parametrisierung des Zinkatoms führen bei CHARMM Minimierungen unter Umständen zu einer Verschiebung des Zinkatoms unter Auflösung der tetraedrischen Koordination. Es ist empfehlenswert die Inputdatei für CHARMM durch folgende Zeilen zu ergänzen.

Define LIG sele (resi 669 .and. resi 731 .and. resi 606 .and. resi 604) end
Cons fix sele LIG end

Dies geschieht am einfachsten mit dem Editor „jot“. Hierdurch werden das Zinkion und die für die Koordination des Zn^{2+} essentiellen Reste korrekt fixiert. Zuvor muss die Nummerierung der Reste in WitnotP geändert werden. In der Datei aus der PDB beginnt die Nummerierung der Reste im α und β Subunit jeweils bei „1“. Eine doppelte Belegung wird von CHARMM nicht toleriert. Deshalb ist die Nummerierung in WitnotP zu ändern:

WitnotP:

Modify resnum ftase 1 done

Die Reste Cys 299 β, His 362 β, Asp 297 β und Zn 1001 werden umbenannt zu Cys 606, Asp 604, His 669 und Zn 731.

3D Strukturen von Pepticinammin E und den biologisch aktiven Analoga.

Beispiel Pepticinnamin E

WitnotP:

Build fragment aminoacid phenylalanin get Pepte done

Durch entsprechendes Markieren werden folgende Fragmente, mit den jeweils vordefinierten Atomparametern, angefügt: Tyrosine (2 mal), Ethylene (2mal), Keto (1mal), C(sp3) (8mal), benzene (1mal), chlorine (1mal)

WitnotP:

<:|“prca peptde“

Unix:

Minall_run pepte done

WitnotP:

Delete –molecule pepte done
Read xpdb pepte_m.pdb done
Write xpdb Pepticinammin_E pepte done

Analog dazu wurden die Analoga gezeichnet und minimiert. Entscheidend für korrekte Ergebnisse ist die richtige Parametrisierung der Atome.

Manuelles Docking der Inhibitoren und Analyse der Bindungsmodi

Die vorminimierten Inhibitoren wurden gemäß AAV-MM10 in das aktive Zentrum der jeweiligen Kinasen gedockt. Die sonstigen Eingaben sind hier am Beispiel Pepticinnamin E und Ratten-Farnesyltransferase exemplarisch dargestellt.

WitnotP:

```
Read xpdb ftase.pdb
Read xpdb pepte.pdb
Move –molecule ftase.pdb ftase done
Move –molecule pepte.pdb INHB done
<:|"use INHB" (siehe AAV-MM10)
freeze INHB done
freeze ftase done
move –molecule INHB ftase done
<:|"pdb2c ftase " (siehe AAV-MM2)
```

Unix:

```
Minharmfix_run ftase (siehe AAV-MM5)
```

Vor den Minimierungen muss in jedem Fall eine Kontrolle der Parameter für Histidine und Lysine erfolgen. Ebenso ist die Protonierung von Asparaten und Glutamaten zu kontrollieren

Die Analyse der Wasserstoffbrücken zwischen Protein und Ligand erfolgt gemäß AAV-MM13.

Berechnung der Überlappungsvolumina

Die Vorhersagen des Inhibitionsmechanimus sowie die Quantifizierung der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Pepticinnamin E Analoga und der Farnesyltransferase erfordern eine Berechnung der Überlappungsvolumina gemäß AAV-MM12.

7. Literaturverzeichnis

(1) Ward, N. L.; Dumont, D. J. *Sem. Cell Dev. Biol.* **2002**, *13*, 19-27.

(2) Mason, J.; Mason, A. R.; Cork, M. J. *Bri. J. Derm.* **2002**, *146*, 351-364.

(3) Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*; VCH-Wiley: Weinheim, 1994.

(4) Toogood, P. L. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1-16.

(5) Deubel, D. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5834-5842.

(6) Nicolaou, K. C.; Ritzen, A.; Namoto, K.; Buey, R. M.; Diaz, J. F.; Andreu, J. M.; Wartmann, M.; Altmann, K. H.; O'Brate, A.; Giannakakou, P. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 6413-6432.

(7) Audran, G.; Uttaro, J. P.; Monti, H. *Synlett* **2002**, 1261-1264.

(8) Groom, C. R.; Hopkins, A. L. *Drug Discov.Today* **2002**, *7*, 801-802.

(9) Knighton, D. R.; Zheng, J. H.; Eyck, L. F. T.; Ashford, V. A.; Xuong, N. H. *Science* **1991**, *253*, 407-414.

(10) Cohen, P. *Nature Rev. Cancer* **2002**, *1*, 309-315.

(11) Davies, S. P.; Reddy, H.; Caivano, M.; Cohen, P. *Biochem. J.* **2000**, *351*, 95-105.

(12) Takai, Y.; Kishimoto, M.; Inoue, Y.; Nishizuka, Y. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 7603-7609.

(13) Tamaoki, T.; Nomato, H.; Takahashi, I.; Kato, Y.; Morimoto, F. T. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *135*, 397-402.

(14) Gescher, A. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2000**, *34*, 127-138.

(15) Lopez-Talavera, J. C.; Levitzki, A.; Martinez, A.; Gazit, A.; Esteban, E.; Guardian, J. *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 664-673.

(16) Liebmann, C. *Cell. Signalling* **2001**, *13*, 777-785.

(17) Hubbard, S. R.; Till, J. H. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 373-398.

(18) Madhusudan, E. A. T.; Xuong, N. H.; Adams, J. A.; Ten-Eyck, L. F.; Taylor, S. S.; Sowadski, J. M. *Prot. Sci.* **1994**, *3*, 176-181.

(19) Bridges, A. J. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2541-2571.

(20) Kraus, G. *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*; Wiley-VCH: Weinheim, 1997.

(21) Johnson, L. N.; Noble, M. E. M.; Owen, D. J. *Cell* **1996**, *85*, 149-158.

(22) Mohammadi, M.; Schlessinger, J.; Hubbard, S. R. *Cell* **1996**, *86*, 577-587.

(23) Adams, J. A. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2271-2290.

(24) Cook, P. F.; Neville, M. E.; Vrana, K. E.; Hartl, F. T.; Roskoski, J. R. *Biochemistry* **1982**, *21*, 5794.

(25) Cole, P. A.; Grace, M. R.; Phillips, R. S.; Burn, P.; Walsh, C. T. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 22105-22121.

(26) Ho, M. F.; Bramson, H. N.; Hansen, D. E.; Knowles, J. R.; Kaiser, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2680-2684.

(27) Jussila, L.; Alitalo, K. *Phys. Rev.* **2002**, *82*, 673-700.

(28) Clark, E. A.; Brugge, J. S. *Science* **1995**, *268*, 233-239.

(29) Bargmann, C. I.; Hung, M.-C.; Weinberg, R. A. *Nature* **1986**, *§!)*, 226-230.

(30) Beerli, R. R.; Wels, W.; Heynes, N. E. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 23931-23936.

(31) Cheatham, B.; Vlahos, C. J.; Cheatham, L.; Wang, L.; Blenis, J. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*, 4902-4911.

(32) Okada, T.; Kawano, Y.; Sakakibara, T.; Hazeki, O.; Uli, M. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 3568-3573.

(33) Slamon, D. J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 783-792.

(34) Wittinghofer, A.; Waldmann, H. *Angew. Chem.Int. Ed.* **2000**, *39*, 4193-4214.

(35) Schimmoller, F.; Simon, I.; Pfeffer, S. R. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22161-22164.

(36) Leonard, D. M. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2971-2990.

(37) Schweins, T.; Geyer, M.; Scheffzek, K.; Warshel, A.; Kalbitzer, H. R.; Wittinghofer, A. *Nature* **1995**, *2*, 36-44.

(38) Cepus, V.; Scheidig, A. J.; Goody, R. S.; Gerwert, K. *Biochemistry* **1998**, *37*, 10263-10271.

(39) Maegley, K. A.; Admiraal, S. J.; Herschlag, D. *Proc. Natl. Acad. Sci* **1996**, *93*, 8160-8165.

(40) Scheffzek, K.; Ahmadian, M. R.; Kabsch, W.; Wiesmuller, L.; Lautwein, A.; Schmitz, F.; Wittinghofer, A. *Science* **1997**, *277*, 333-338.

(41) Zor, T.; Halifa, I.; Kleinhaus, S.; Chorev, M.; Selinger, Z. *Biochem. J.* **1995**, *306*, 253-258.

(42) Zor, T.; Baryaacov, M.; Elgavish, S.; Shaanan, B.; Selinger, Z. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *249*, 330-336.

(43) Zor, T.; Andorn, R.; Sofer, I.; Chorev, M.; Selinger, Z. *FEBs Lett.* **1998**, *433*, 326-330.

(44) Ahmadian, M. R.; Zor, T.; Vogt, D.; Kabsch, W.; Selinger, Z.; Wittinghofer, A.; Scheffzek, K. *Proc. Natl. Acad. Sci* **1999**, *96*, 7065-7070.

(45) Gail, R.; Costisella, B.; Ahmadian, M. R.; Wittinghofer, A. *Chembiochem* **2001**, *2*, 570-575.

(46) Guo, Z.; Zhou, D.; Schultz, P. G. *Science* **2000**, *288*, 2042-2045.

(47) Ye, H. F.; O'Reilly, K. E.; Koh, J. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*.

(48) Willumsen B.M., C. A., Hubert N.L., Papageorge A.G., Lowry D.R., *Nature* **1984**, *310*, 583-586.

(49) Sebti, S. M.; Hamilton, A. D. *Oncogene* **2000**, *19*, 6584-6593.

(50) Lerner, E. C.; Qian, Y. M.; Hamilton, A. D.; Sebti, S. M. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26770-26773.

(51) Gibbs, R. A.; Zahn, T. J.; Sebolt-Leopold, J. S. *J. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1437-1465.

(52) Waldmann, H.; Thutewohl, M. *Top. Curr. Chem.* **2001**, *211*, 117-130.

(53) Hinterding, K.; Hagenbuch, P.; Retey, J.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1236-1239.

(54) Hinterding, K.; Hagenbuch, P.; Retey, J.; Waldmann, H. *Chemistry Eur. J.* **1999**, *5*, 227-236.

(55) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Del. Rev.* **1997**, *23*, 3-25.

(56) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Del. Rev* **2001**, *46*, 3-26.

(57) Tewari, Y.; Miller, M.; Wasik, S.; Martire, D. J. *J. Chem. Eng. Data* **1982**, *27*, 451-455.

(58) Fujita, T.; Iwasa, J.; Hansch, C. *J. Am. Chem. Soc.* **19864**, *86*, 5157-5159.

(59) Rekker, R. *The Hydrophobic Fragmental Constant*; Elsevier: Amsterdam, 1977.

(60) Sites, W. E. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1233-1250.

(61) Jones, S.; Thornton, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 13-20.

(62) Cochran, A. G. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, R85-R94.

(63) Burgess, K. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 826-835.

(64) Loffet, A. *J. Peptide Sci* **2002**, *8*, 1-7.

(65) Sawyer, T. K. *Biopolymers* **1998**, *47*, 243-261.

(66) Finch, A.; Wong, A. K.; Paczkowski, N. J. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1965-1974.

(67) Schreiber, S. L. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1127-1152.

(68) Ludolph, B.; Eisele, F.; Waldmann, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5954-5955.

(69) Merrifield, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2153.

(70) Merrifield, B. *Prot. Sci.* **1996**, *5*, 1947-1951.

(71) Merrifield, B. *Biopolymers* **1995**, *37*, 3-4.

(72) Bagno, A.; Bicciato, S.; Dettin, M.; Dibello, C. *Int. J.Pep. Prot.Res.***1997**, *50*, 231-237.

(73) Lam, K. S.; Lebl, M.; Krchnak, V. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411-448.

(74) Czarnik, A. W. *Curr. Op. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 60-66.

(75) Gohlke, H.; Klebe, G. *Curr. Op. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 231-235.

(76) Moore, G. E. *Electronics* **1965**, *38*, 475-478.

(77) Brauer, M.; Kunert, M.; Dinjus, E.; Klussmann, M.; Doring, M.; Gorls, H.; Anders, E. *Theochem J. Mol. Struct.* **2000**, *505*, 289-301.

(78) A. D. MacKerell, J.; Brooks, B.; C. L. Brooks, I.; Nilsson, L.; Roux, B.; Won, Y.; Karplus, M. In *The Encyclopedia of Computational Chemistry*; P., et, v. R. S., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, 1998; Vol. 1, p 271-277.

(79) Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. *J. Comp. Chem* **1983**, *4*, 187-217.

(80) Budin, N.; Ahmed, S.; Majeux, N.; Caflisch, A. *J. Comb. Chem.* **2001**, *4*, 661-673.

(81) Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipmann, D. J. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403-410.

(82) Morgenstern, B. *Bioinformatics* **1999**, *15*, 211-218.

(83) Eddy, S. R. *Bioinformatics* **1998**, *14*, 755-763.

(84) Sali, A. *Mol. Med. Today* **1995**, *1*, 270-277.

(85) Jones, G.; Willet, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727-739.

(86) Jones, G.; Willet, P.; Glen, R. C. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43-48.

(87) Holland, J. *Adaptation in Natural and Artificial Systems*; second edition ed.; M.I.T. Press: Cambridge MA, 1992.

(88) Lucasius C.B., K. G. *Chemometr. Intell. Lab.* **1993**, *19*, 1-9.

(89) Klebe, G., Universität Heidelberg, 1991.

(90) Schmid, R. *Monatsh.* **2001**, *132*, 1295-1326.

(91) Southall, N. T.; Dill, K. A.; Haymet, A. D. J. *J. Phys. Chem.* **2002**, *106*, 521-533.

(92) Colmenarejo, G.; Alvarez-Pedraglio, A.; Lavandera, J. L. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4370-4378.

(93) Brady, G. P.; Stouten, P. F. W. *PASS Manual* **1997**.

(94) Majeux, N.; Scarsi, M.; Apostolakis, J.; Ehrhardt, C.; Caflisch, A. *Proteins* **1999**, *37*, 88-105.

(95) Reineke, U.; Schneider-Mergener, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 769-771.

(96) Pai, E. F.; Krengel, U.; Petsko, G. A.; Goody, R. S.; Kabsch, W.; Wittinghofer, A. *EMBO J.* **1990**, *9*, 2351-2360.

(97) Geyer, M.; Schweins, T.; Herrmann, C.; Prisner, T.; Wittinghofer, A.; Kalbitzer, H. R. *Biochemistry* **1996**, *35*, 10308-10320.

(98) Oivanen, M.; Kuusela, S.; Lonnberg, H. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 961-990.

(99) Berkessel, A.; Riedl, R. *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 215-219.

(100) Seltzman, H. H.; Berran, B. D. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3083-3086.

(101) Park, K. K.; Oh, C. H.; Joung, W. K. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7445-7446.

(102) Rouden, J.; Bernard, A.; Lasne, M.-C. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8109-8112.

(103) Carpino, L. A.; Imazumi, H.; El-Faham, A.; Ferrer, F. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 442-445.

(104) Sieber, P. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1637-1638.

(105) Ramage, R. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2287-2289.

(106) Vaino, A. R.; Janda, K. D. *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 579-596.

(107) Hudson, D. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 334-360.

(108) Marshall, M. *Oncogene* **1995**, *10*, 1283-1290.

(109) Kapoor, T. M.; Andreotti, A. H.; Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 23-29.

(110) Morken, J. P.; Kapoor, T. M.; Feng, S. B.; Shirai, F.; Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 30-36.

(111) Xiao, X.; Zhao, C.; Potash, H.; Nova, M. P. *Angew. Chem. Intl. Ed.* **1997**, *36*, 87-91.

(112) Morr, M.; Waßmann, A.; Wray, V. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 2985-2996.

(113) Desaubry, L.; Johnson, R. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 123-126.

(114) Nyilas, A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2517-2518.

(115) DiStefano, G. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *49*, 1769-1776.

(116) Hoard, D. E.; Ott, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1785-1788.

(117) Chow, C. P.; Berkman, C. E. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7471-7474.

(118) T. W. Greene, P. G. M. W. *Protective Groups in Organic Synthesis*; 3 ed.; John Wiley&Sons: New York, 1999.

(119) Sieber, P. *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 2711-2715.

(120) Forsch, R. A.; Rosowsky, A. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 1305-1311.

(121) Neises, B.; Steglich, W. *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 556-557.

(122) Silverberg, L. J.; Dillon, J. L.; Vemishetti, P. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 771-774.

(123) ScheppeckII, J. E.; Kar, H.; Hong, H. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5329-5333.

(124) Seitz, O.; Kunz, H. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813-826.

(125) McCarty, J. S.; Walker, G. C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**,*88*, 9513-9517.

(126) Neckers, L. *Trends Mol. Med.* **2002**, *8*, S55-S61.

(127) Peake, P.; Winter, N.; Britton, W. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1387*, 387-394.

(128) *Katalog der Firma Rapp Polymere 2001*.

(129) Renil, M.; Ferreras, M.; Delaisse, J. M.; Foged, N. T.; Meldal, M. *J. Pep. Sci.* **1998**, *4*, 195-210.

(130) Meldal, M.; Svendsen, I.; Juliano, L.; Juliano, M. A.; Delnery, E.; Scharfstein, J. *J. Pep. Sci.* **1998**, *4*, 83-91.

(131) Owalabi, J. B.; Rikalla, G.; Tehim, A.; Ross, G. M.; Riopelle, R. J.; Kambolj, R.; Ossipov, M.; Bian, D.; Wegert, S.; Porreca, F.; Lee, D. K. H. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **1999**, *289*, 1271-1276.

(132) Auch die Kupplung an festphasengebundenes Phosphotyrosin gelang. Die Methode zur Synthese von Nucleosidtriphosphat Konjugaten ist daher auch zur Synthese von ATP-Peptidkonjugaten einsetzbar. Die analytischen Daten wurden von Herrn Dr. Courtney Aldrich aufgezeichnet.

(133) Rensland, H.; John, J.; Linke, R.; Simon, I.; Schlichting, I.; Wittinghofer, A.; Goody, R. S. *Biochemistry* **1995**, *34*, 593-599.

(134) Bold, G.; Altmann, K.-H.; Frei, J.; Lang, M.; Manley, W. M.; Traxler, P.; Wood, J. M. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2310-2323.

(135) Stahl, P. Doktorarbeit, Universität Karlsruhe, 1999.

(136) Stahl, P.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3710-3713.

(137) Stahl, P.; Kissau, L.; Mazitschek, R.; Huwe, A.; Furet, P.; Giannis, A.; Waldmann, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11586-11593.

(138) Marti-Renom, M. A.; Stuart, A. C.; Fiser, A.; Sanchez, R.; Melo, F.; Sali, A. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 291-325.

(139) McTigue, M. A.; Wickersham, J. A.; Pinko, C.; Showalter, R. E.; Parast, C. V.; Tempczyk-Russell, A.; Gehring, M. R.; Mroczkowski, B.; Kan, C.-C.; Villafranca, J. E.; Appelt, K. *Structure* **1999**, *7*, 319-330.

(140) Mohammadi, M.; Froum, S.; Hamby, J. M.; Schroeder, M. C.; Panek, R. L.; Lu, G. H.; Eliseenkova, A. V.; Green, D.; Schlessinger, J.; Hubbard, S. R. *EMBO J.* **1998**, *17*, 5896-5904.

(141) Dies Strukturen sind den PDB Einträgen 1FGI and 2FGI entnommen.

(142) Vriend, G. *J. Mol. Graph.* **1990**, *8*, 52-56.

(143) Hooft, R. W. W.; Vriend, G.; Sander, C.; Abola, E. E. *Nature* **1996**, *381*, 272-274.

(144) Fernandez, A.; Colubri, A.; Appignanesi, G. *Phys. Rev.* **2001**, *6402*, 1901-+.

(145) Höltje, H. D.; Folkers, G. *Molecular Modeling - Basic Principles and Applications*; VCH: Weinheim, 1996; Vol. 5.

(146) Bolton, J. L.; Trush, M. A.; Penning, T. M.; Dryhurst, G.; Monks, T. J. *Chem.Res. Tox.*__2000__, *13*, 135-160.

(147) Sunazuka, T.; Handa, M.; Nagai, K.; Shirahata, T.; Harigaya, Y.; Otoguro, K.; Kuwajima, I.; Omura, S. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 367-9.

(148) Taniguchi, M.; Watanabe, M.; Nagai, K.; Suzumura, K.; Suzuki, K.; Tanaka, A. *J. Antibiotics* **2000**, *53*, 844-7.

(149) Weinz, C.; Blaschke, G. *J. Chromat.* **1995**, *674*, 287-292.

(150) Rose, S. *Drug Discov.Today* **2002**, *7*, 133-138.

(151) Long, S. B.; Casey, P. J.; Beese, L. S. *Biochemistry* **1998**, *37*, 9612-9618.

(152) Long, S. B.; Casey, P. J.; Beese, L. S. *Structure* **2000**, *8*, 209-222.

(153) Long, S. B.; Hancock, P. J.; Kral, A. M.; Hellinga, H. W.; Beese, L. S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 12948-12953.

(154) Thutewohl, M.; Kissau, L.; Popkirova, B.; Karaguni, I.-M.; Nowak, T.; Bate, M.; Kuhlmann, J.; Müller, O.; Waldmann, H. *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3768-3772.

(155) Klug, A.; Rhodes, D. *Trends Biochem. Sci.* **1988**, *12*, 45-51.

(156) Dudev, T.; Lim, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11146-11153.

(157) Barrett, D.; Barlocco, D. *Drug Disc.Today* **2002**, *7*, 325-326.

(158) Janeway, C. M. L.; Xu, X.; Murphy, J. E.; Chaindaroglou, A.; Kantrowitz, E. R. *Biochemistry* **1993**, *32*, 1603-1611.

(159) Hyvonen, M.; Saraste, M. *EMBO J.* **1997**, *16*, 3396-3401.

(160) Pan, H.; Wigley, D. B. *Structure* **2000**, *8*, 231-239.

(161) Bohm, M.; Mitsch, A.; Wissner, P.; Sattler, I.; Schlitzer, M. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3117-3124.

(162) Scrutton, N. S.; Raine, A. R. C. *Biochem. J.* **1996**, *319*, 1-8.

(163) Cubero, E.; Luque, F. J.; Orozco, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 5976-5980.

(164) Burley, S. K.; Petsko, G. A. *FEBS Lett.* **1986**, *203*, 139-143.

(165) Sakowski, J.; Sattler, I.; Schlitzer, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 233-239.

(166) Shiomi, K.; Yang, H.; Inokoshi, J.; Pyl, D. v. d.; Nakagawa, A.; Takeshima, H.; Omura, S. *J. Antibiotics* **1993**, *46*, 229-234.

(167) Nummerierung, J.

(168) Thern, B.; Rudolph, J.; Jung, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2307-2309.

(169) Thutewohl, M. Doktorarbeit, Universität Dortmund, 2002.

(170) Pompliano, D. L.; Gomez, R. P.; Anthony, N. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7945-7946.

(171) Vedani, A.; Dunitz, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7653-7658.

(172) Görbitz, C. H. *Acta Cryst.* **1989**, *B45*, 390-397.

(173) Murray-Rust, P.; Glusker, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106,*, 1018-1023.

(174) Taylor, R.; Kennard, O. *Acc. Chem. Res.* **1984**, *17*, 320-329.

(175) Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615-2623.

(176) Hollosy, F.; Lorand, T.; Orfi, L.; Eros, D.; Keri, G.; Idei, M. *J. Chromat.* **2002**, *768*, 361-368.

(177) Bell, I. M.; Gallichio, S. N. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2388-2394.

(178) Renil, M.; Meldal, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4647-4650.

(179) Kaiser, E. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.

(180) Widmer, A., WitnotP ist ein Molecular Modelling Programm, dass bei Novartis entwickelt wurde. Aufbau und Funktion sind mit InsightII von Accelrys Inc. vergleichbar.

(181) Cho, K. H.; Kang, Y. K.; No, K. T.; Scheraga, H. A. *J.Phys. Chem.***2001**, *105*, 3624-3634.

(182) Claus Ehrhardt, Novartis Pharma AG, Persönliche Mitteilung

(183) Vetter, I., Persönliche Mittelung

(184) Casella, L.; Gulotti, M. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1991**, *22*, 1611-1612.

(185) Volkmer-Engert, R.; Hoffmann, B.; Schneider-Mergener, J. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1029-1032.

8. Anhang

Anhang I:	Abkürzungen
Anhang II:	Strukturen von Kupplungsreagentien und Linkern
Anhang III:	Homologiemodell der PP2A
Anhang IV:	Ribbon Diagramme der Kinasemodelle
Anhang V:	Ramachandran Plots der Kinasemodelle
Anhang VI:	Whatcheck Analyse der Kinasemodelle
Anhang VII:	Input Dateien für Molecular Modelling Arbeiten (PEP, GOLD)
Anhang VIII:	Inhaltsverzeichnis der beigefügten CD (PDB Dateien der Modelle etc.)
Anhang IX:	Tabellen der Wasserstoffbrücken zwischen Liganden und Rezeptoren
Anhang X:	Kombinatorische Bibliothek von Pepticinnamin E Analoga
Anhang XI:	Signalkaskaden, die für die vorliegende Arbeit relevant sind (Doppelseite zum Ausklappen)

8.1 Anhang I: Abkürzungsverzeichnis

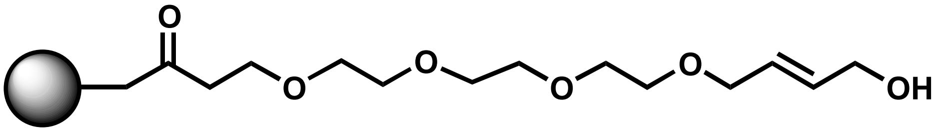
AA	Aminosäure
3-NBA	3-Nitrobenzylalkohol
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
AAV-MM	Allgemeine Arbeitsvorschrift Molecular Modelling
Abs.	Absolut
AMPS	Aminomethyl-Polystyrol
AppNHp	Adenosin-5'-[β-γ-imido]triphosphat
Äq.	Äquivalente
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Boc	*N-tert*-Butyloxycarbonyl
CDI	Carbonyl-Diimidazol
CHARMM	Chemistry at Harvard Molecular Mechanics[9]
DIC	*N,N*'-Diisopropylcarbodiimid
DIEA	*N*-Ethyldiisopropylamin
DMAP	4-*N,N*-Dimethylaminopyridin
DMF	*N,N*-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGFR	Endothelial Growth Factor Receptor
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FAB	Fast Atom Bombardment
FGF1R	Fibroblast Growth Factor 1 Receptor (Kinase)
Fmoc	*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl
ges.	Gesättigt
GGTase	Geranylgeranyltransferase
GOLD	Genetic Optimisation for Ligand Design
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H	Stunde

[9] Für diese Arbeiten wurde ausschließlich die für akademische Institutionen herausgegebene Version 27b verwendet. Dieser Satz von Parametern unterscheidet sich von dem, der von Accelrys Inc. als CHARMm vertrieben wird.

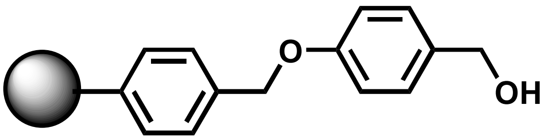
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
IEC	Ion-Exchange-Chromatographie
IGF1R	Insulin Like Growth Factor 1 Receptor (Kinase)
M	Molarität
min	Minute
NBS	*N*-Bromsuccinimid
PEGA	Polyethylenglykol-Acrylamid-Copolymer
PEP	Peptide Engineering Programm
PFT	Protein Farnesyl Transferase
PS-Harz	Polystyrol-Harz
R_f	Retentionsfaktor
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
Smp.	Schmelzpunkt
TBABr	Tetrabutylammoniumbromid
TBACl	Tetrabutylammoniumchlorid
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Dünnschichtchromatographie
VEGFR-2 (3)	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (3)
WitnotP	**W**hat **i**s **t**he **n**ame **o**f **t**his **p**rogram?[10]
Zers.	Zersetzung

[10] Herr Dr. A.Widmer, Novartis AG, der dieses Programm entwickelt hat, beantwortete die Frage mit dem Acronym.

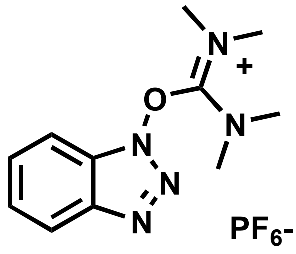
8.2 Anhang II: Strukturen von Reagentien und Linkern



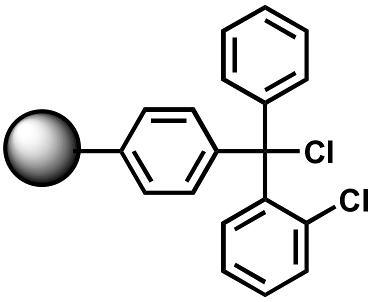
HYCRON-Linker



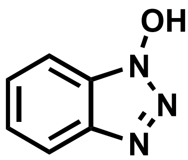
Wang-Linker



HBTU



Cl-Trityl-Linker



HOBt

8.3 Anhang III: Homologiemodell der PP2A

In einem weiteren kleinen Projekt wurde für die Aufklärung der Bindungsstelle von Cytostatin (siehe Dissertation Laurent Bialy) eine Homologiemodell der PP2A unter Verwendung der Struktur der PP1 als Templat erstellt. Dieses Modell kann für die weitere Aufklärung der Wirkung von Cytostatin hilfreich sein, allerdings sind zunächst weiterführende Messung zur Aufklärung des Inhibitionsmechanismus erforderlich. Die Koordinaten des Modells sind auf der beiliegenden CD im Verzeichnis PP2A gespeichert. Zum Vergleich sind hier die Ribbon-Diagramme der katalytischen Untereinheiten der PP2A und der PP1 abgebildet. Ebenfalls gezeigt ist das zur Erstellung der Homologiemodelle verwendete Alignment der beiden Primärsequenzen.

```
PP1     KLNIDSIIQRLLEVRGSKPGKNVQLQENEIRGLCLKSREIFLSQPILLELEAPLKICGDI
PP2A    --MDEKVFTKELDQWIEQLNECKQLSESQVKSLCEKAKEILTKESNVQEVRCPVTVCGDV

PP1     HGQYYDLLRLFEYGGFPPESNYLFLGDYVDRGKQSLETICLLLAYKIKYPENFFLLRGNH
PP2A    HGQFHDLMELFRIGGKSPDTNYLFMGDYVDRGYYSVETVTLLVALKVRYRERITILRGNH

PP1     ECASINRIYGFYDECKRRY-NIKLWKTFTDCFNCLPIAAIVDEKIFCCHGGLSPDLQSME
PP2A    ESRQITQVYGFYDECLRKYGNANVWKYFTDLFDYLPLTALVDGQIFCLHGGLSPSIDTLD

PP1     QIRRIMRPTDVPDQGLLCDLLWSDPDKDVLGWGENDRGVSFTFGAEVVAKFLHKHDLDLI
PP2A    HIRALDRLQEVPHEGPMCDLLWSDPDDR-GGWGISPRGAGYTFGQDISETFNHANGLTLV

PP1          CRAHQVVEDGYEFFAKRQLVTLFSAPNYCGEFDNAGAMMSVDETLMCSFQILKPA
PP2A         SRAHQLVMEGYNWCHDRNVVTIFSAPNYCYRCGNQAAIMELDDTLKYSFLQFDPA
```

Abbildung A3-1: Alignment der Primärsequenzen von PP1 und PP2A.

Die grün unterlegten Reste könnten laut Modelling Analyse für die Selektivität von Cytostatin zugunsten PP2a verantwortlich sein. In Abbildung A3-2 sind die Ribbon Diagramme der PP1 (a) und PP2A (b) gezeigt. In der PP1 Struktur belegt Okadasäure das aktive Zentrum.

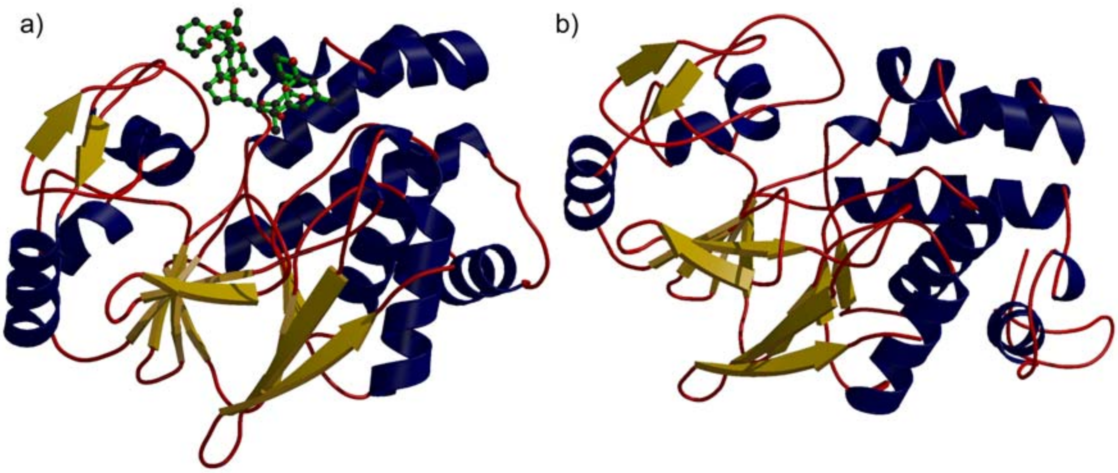
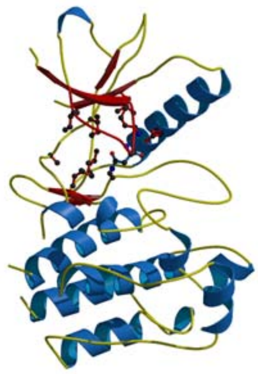
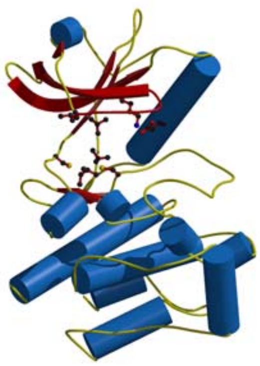
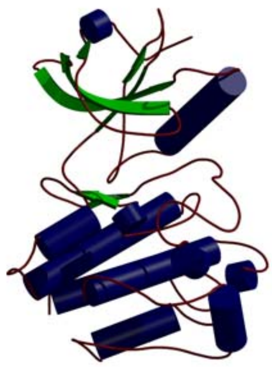


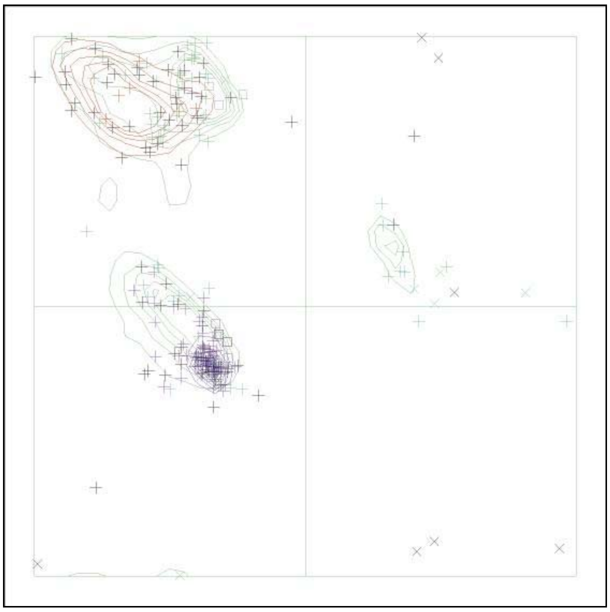
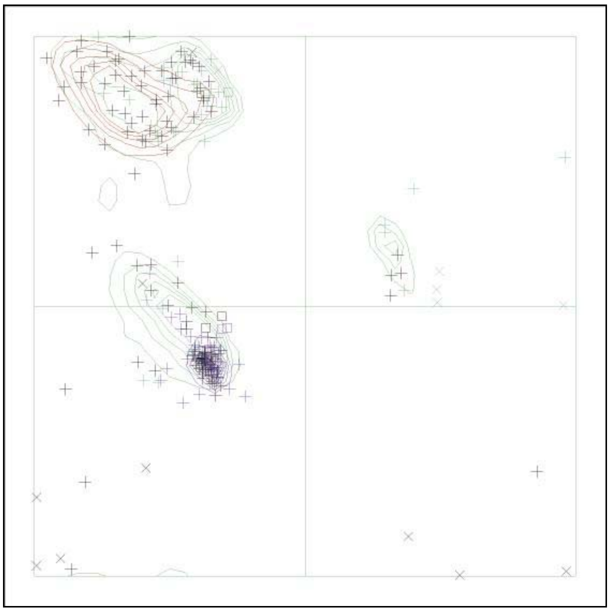
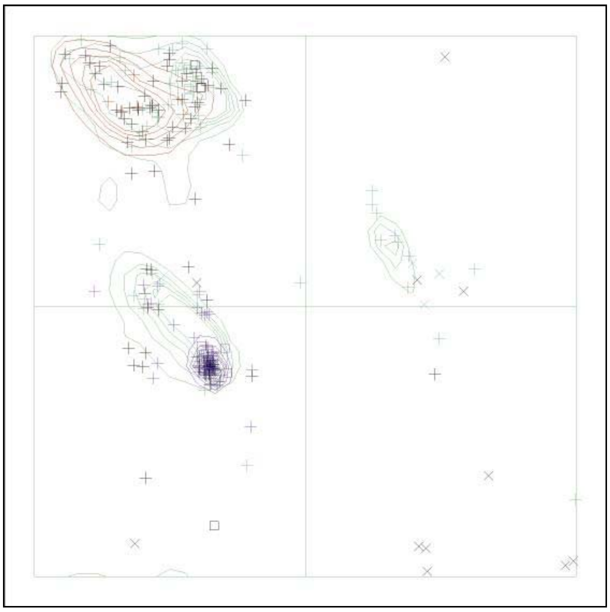
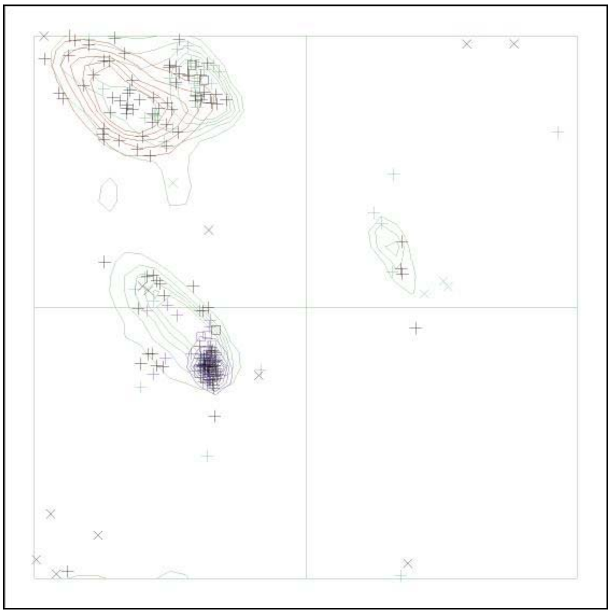
Abbildung A3-2: a) Ribbon Diagramme der PP1 b) Ribbondiagramm des Homologiemodells der PP2A.

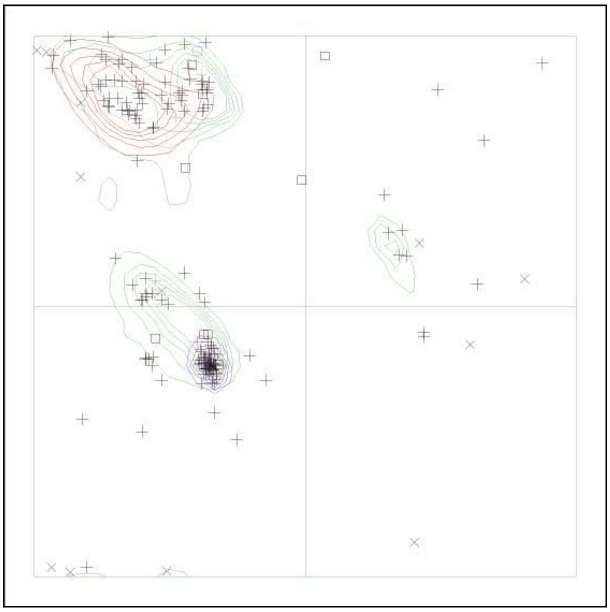
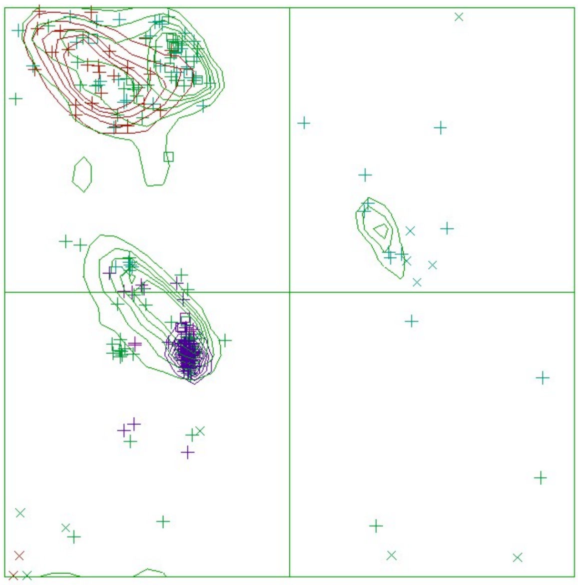
8.4 Anhang IV: Ribbon-Darstellung der Homologiemodelle:

Diese Abbildungen wurden gemäß AAV-MM19 erstellt. Hierfür wurden die Programme RASMOL, MOLSCRIPT und RASTER3D verwendet.[Merritt, 1997 #140]

Tie-2 Modell A	Tie-2 Modell B
	
VEGFR-2 Modell A	VEGFR-2 Modell B
	
VEGFR-3	ErbB-2
	

8.5 Anhang V: Ramachandran Diagramme der Homologiemodelle

8.5.1 Tie-2 (Templat 1FGI)	8.5.2 Tie-2 (Templat 2FGI)
	
8.5.3 VEGFR-2 (Templat 1FGI)	**8.5.4 VEGFR-2 (Templat 2FGI)**
	

8.5.5 ErbB-2 (Templat IGR1R)	8.5.6 VEGFR-3 (Templat 2FGI)
	

8.6 Anhang VI: WHATCHECK Analyse der Kinasemodelle

Die kompletten WHATCHECK Analysen aller Homologiemodelle (ca. 25-30 DIN A4 Seiten pro Modell) sind auf der beiliegenden CD gespeichert. Auszugsweise seien hier die wichtigsten Resultate abgedruckt.

8.6.1 Erklärungen der Bewertungen:

8.6.1.1 Ramachandran Score und Ramachandran Plot

Die Auftragung der Phi und Psi Winkel (Ramachandran Plot) ist die älteste Methode der Qualitätsüberprüfung für Proteinstrukturen. Da selbst in den besten Kristallstrukturen einige Nicht-Glycin Reste außerhalb der erwarteten Bereich zu finden sind, bewertet WHATCHECK den Gesamteindruck in einem Ramachandran-Score. Die Bewertung ist so geeicht, dass die Werte nahe an Null liegen sollten. Werte unter –3 zeigen eine falsche Backbone Struktur an.

8.6.1.2 Chi-1/Chi-2 Score:

Verschiedene Seitenketten bevorzugen unterschiedliche Konformationen in Abhängigkeit von der lokalen Umgebung (ob Helix oder Faltblatt etc.). WHATHCHECK analysiert jede Aminosäure und berechnet auch hier einen Wert für den Gesamteindruck. Da MODELLER bei der Konstruktion der Modelle auch eine Optimierung dieser Konformationen durchführt, kann durch diese Analyse eine recht wahrscheinliche Seitenkettenkonformation ermittelt werden.

8.6.1.3 Inside/outside Profil:

In globulären Proteinen finden sich hydrophobe Aminosäuren eher im Inneren als auf der Oberfläche. Für hydrophile Aminosäure gilt das Umgekehrte. Diese Überprüfung validiert die korrekte Anordnung der Aminosäuren auf dem Templat sowie die richtige Position der Seitenketten. Für normale globuläre Proteine sollte die WHATCHECK Berechnung einen Wert nahe 1.0 ergeben.

8.6.2 Ausschnitte aus den Analysen

8.6.2.1 VEGFR-2 Modell A

2.11 Final summary

2.11.1 Note: Summary report for users of a structure

This is an overall summary of the quality of the structure as compared with current reliable structures. This summary is most useful for biologists seeking a good structure to use for modelling calculations.

The second part of the table mostly gives an impression of how well the model conforms to common refinement constraint values. The first part of the table shows a number of constraint-independent quality indicators.

Structure Z-scores, positive is better than average:

2nd generation packing quality :	-2.583	
Ramachandran plot appearance :	-0.241	
χ-1/χ-2 rotamer normality :	0.095	
Backbone conformation :	-0.714	

RMS Z-scores, should be close to 1.0:

Bond lengths :	0.958	
Bond angles :	1.261	
Omega angle restraints :	0.721	(tight)
Side chain planarity :	0.309	(tight)
Improper dihedral distribution :	0.900	
B-factor distribution :	0.357	
Inside/Outside distribution :	1.047	

8.6.2.2 VEGFR-2 Modell B

2.11 Final summary

2.11.1 Note: Summary report for users of a structure

This is an overall summary of the quality of the structure as compared with current reliable structures. This summary is most useful for biologists seeking a good structure to use for modelling calculations.

The second part of the table mostly gives an impression of how well the model conforms to common refinement constraint values. The first part of the table shows a number of constraint-independent quality indicators.

Structure Z-scores, positive is better than average:

2nd generation packing quality :	-2.374	
Ramachandran plot appearance :	-0.163	
χ-1/χ-2 rotamer normality :	0.420	
Backbone conformation :	-0.095	

RMS Z-scores, should be close to 1.0:

Bond lengths :	0.947	
Bond angles :	1.195	
Omega angle restraints :	0.527	(tight)
Side chain planarity :	0.329	(tight)
Improper dihedral distribution :	0.836	
B-factor distribution :	0.357	
Inside/Outside distribution :	1.095	

8.6.2.3 VEGFR-3

2.11 Final summary

2.11.1 Note: Summary report for users of a structure

This is an overall summary of the quality of the structure as compared with current reliable structures. This summary is most useful for biologists seeking a good structure to use for modelling calculations.

The second part of the table mostly gives an impression of how well the model conforms to common refinement constraint values. The first part of the table shows a number of constraint-independent quality indicators.

Structure Z-scores, positive is better than average:

2nd generation packing quality :	-2.034	
Ramachandran plot appearance :	0.093	
χ-1/χ-2 rotamer normality :	0.049	
Backbone conformation :	-0.564	

RMS Z-scores, should be close to 1.0:

Bond lengths :	0.955	
Bond angles :	1.200	
Omega angle restraints :	0.624	(tight)
Side chain planarity :	0.337	(tight)
Improper dihedral distribution :	0.845	
B-factor distribution :	0.354	
Inside/Outside distribution :	1.053	

8.6.2.4 Tie-2 Modell A

Structure Z-scores, positive is better than average:

2nd generation packing quality :	-3.334	(poor)
Ramachandran plot appearance :	-0.550	
χ-1/χ-2 rotamer normality :	-0.183	
Backbone conformation :	-0.914	

RMS Z-scores, should be close to 1.0:

Bond lengths :	0.942	
Bond angles :	1.290	
Omega angle restraints :	0.656	(tight)
Side chain planarity :	0.302	(tight)
Improper dihedral distribution :	0.821	
Inside/Outside distribution :	1.155	

8.6.2.5 Tie-2 Modell B

2.11 Final summary

2.11.1 Note: Summary report for users of a structure

This is an overall summary of the quality of the structure as compared with current reliable structures. This summary is most useful for biologists seeking a good structure to use for modelling calculations.

The second part of the table mostly gives an impression of how well the model conforms to common refinement constraint values. The first part of the table shows a number of constraint-independent quality indicators.

Structure Z-scores, positive is better than average:

2nd generation packing quality :	-2.930	
Ramachandran plot appearance :	0.120	
χ-1/χ-2 rotamer normality :	-0.588	
Backbone conformation :	-1.107	

RMS Z-scores, should be close to 1.0:

Bond lengths :	0.946	
Bond angles :	1.215	
Omega angle restraints :	0.610	(tight)
Side chain planarity :	0.459	(tight)
Improper dihedral distribution :	0.821	
B-factor distribution :	0.364	
Inside/Outside distribution :	1.131	

8.6.2.6 ErbB-2

2.11 Final summary

2.11.1 Note: Summary report for users of a structure

This is an overall summary of the quality of the structure as compared with current reliable structures. This summary is most useful for biologists seeking a good structure to use for modelling calculations.

The second part of the table mostly gives an impression of how well the model conforms to common refinement constraint values. The first part of the table shows a number of constraint-independent quality indicators.

Structure Z-scores, positive is better than average:

2nd generation packing quality :	-3.121	(poor)
Ramachandran plot appearance :	0.401	
χ-1/χ-2 rotamer normality :	-0.585	
Backbone conformation :	-0.855	

RMS Z-scores, should be close to 1.0:

Bond lengths :	0.972	
Bond angles :	1.284	
Omega angle restraints :	0.658	(tight)
Side chain planarity :	0.560	(tight)
Improper dihedral distribution :	0.938	
B-factor distribution :	0.355	
Inside/Outside distribution :	1.128	

8.7 Anhang VII: Input Dateien für Molecular Modelling Arbeiten

8.7.1 HYDROMAP

Diese Input Datei wurde für die Berechnungen der Hydrophobizitätskarten von Ras verwendet. Die gleichen Einstellungen wurden für alle anderen Berechnungen mit HYDROMAP verwendet. Die entsprechenden Dateien sind im Verzeichnis HYDROMAP auf der beiliegenden CD enthalten.

```
# File type: mol2 (m) or PDB (p)
m
# Path of the coordinate file
./inputs/ras_hyd.mol2
# Path of the parameter file (if mol2 format: ./inputs/RvdwEvdw_new)
./inputs/RvdwEvdw_new
# Solute dielectric
1.
# Solvent dielectric
78.5
# Number of most hydrophobic points to save and display
50
# Radius of the probe sphere
1.4
# Scaling factor for the electrostatic desolvation
1.
# Scaling factor for the vdW interactions
1.
# Path of the GRASP executable
/xprog/bin/grasp
```

8.7.2 PEP

```
RECEPTOR
read param /hero/work/kissau/pepruns/pepparam/MSI_PARAM
read topo /hero/work/kissau/pepruns/pepparam/PEP_ligand.rtf
read pdb /hero/work/kissau/pepruns/180601/g12vpep180601.pdb
set binding_site
88
0  -1  -1  0
7  -1  -1  0
8  -1  -1  0
9  -1  -1  0
10  -1  -1  0
```

11 -1 -1 0

In der selben Weise sind die Aminosäuren 12-40, 55-99 und 111-125 und 144-156 genannt. Damit kann PEP auch Wechselwirkungen berechnen, die etwas weiter weg liegen.

```
156 -1 -1 0
RECEPTOR_END
LIBRARY
read library
read param /hero/work/kissau/pepruns/pepparam/msi_param_old
read topo /hero/work/kissau/pepruns/pepparam/pepd.rtf
read pdb /hero/work/kissau/pepruns/pepparam/pepd.coor
LIBRARY_END
SEED
read param /hero/work/kissau/pepruns/pepparam/msi_param_old
read topo /hero/work/kissau/pepruns/pepparam/pepd.rtf
set defaultLinkAtom 2 2 N2 C6 C1 C5 CA N CA C
read pdb /hero/work/kissau/pepruns/180601/g12vseed180601.pdb
SEED_END
ENERGY
set coulombic.accessType r
set coulombic.fileName coul.ene
set vdW.accessType r
set vdW.repFileName g12v_vdw_rep.ene
set vdW.attFileName g12v_vdw_att.ene
display all
ENERGY_END
GROWING
set param.length global 5
set param.seed global 12345
set param.growingMode global N
display all
run
GROWING_END
exit
```

8.7.3 GOLD

```
GOLD CONFIGURATION FILE
POPULATION
popsiz = 100
select_pressure = 1.100000
```

n_islands = 5

maxops = 100000

niche_siz = 2

GENETIC OPERATORS

pt_crosswt = 95

allele_mutatewt = 95

migratewt = 10

FLOOD FILL

radius = 20

origin = 0 0 0

do_cavity = 1

floodfill_atom_no = 8401

cavity_file = cavity.atoms

floodfill_center = atom

DATA FILES

protein_datafile = /hero/work/kissau/ftase/ftase4docking.mol2

ligand_data_file /hero/work/kissau/ftase/hugi1.mol2 10

ligand_data_file /hero/work/kissau/ftase/hugi2.mol2 10

ligand_data_file /hero/work/kissau/ftase/hugi3.mol2 10

ligand_data_file /hero/work/kissau/ftase/hugi4.mol2 10

ligand_data_file /hero/work/kissau/ftase/hugi5.mol2 10

ligand_data_file /hero/work/kissau/ftase/hugi6.mol2 10

ligand_data_file /hero/work/kissau/ftase/hugi8cbounddyn.mol2 10

ligand_data_file /hero/work/kissau/ftase/peptamine.mol2 10

param_file = DEFAULT

set_ligand_atom_types = 1

set_protein_atom_types = 1

directory = /claudio/work/kissau/ftdockingneu

tordist_file = DEFAULT

make_subdirs = 1

save_lone_pairs = 1

fit_points_file = fit_pts.mol2

read_fitpts = 0

FLAGS

display = 0

internal_ligand_h_bonds = 1

n_ligand_bumps = 0

flip_free_corners = 1

flip_amide_bonds = 1

flip_planar_n = 1

use_tordist = 1

start_vdw_linear_cutoff = 2.5

initial_virtual_pt_match_max = 4

TERMINATION

early_termination = 1

n_top_solutions = 5

rms_tolerance = 1.5

CONSTRAINTS

COVALENT BONDING

covalent = 0

PARALLEL OPTIONS

hostfile = gold.hosts

8.7.4 CHARMM

Die Inputdateien sind Teil der allgemeinen Arbeitsvorschriften AAV-MM1 bis AAV-MM9. Sie werden automatisch durch die dort angegebenen Skripte erzeugt.

8.8 Anhang VIII: Verzeichnis der Dateien auf der beigefügten CD

Ftase: Alle Dateien zu Kapitel 4.3

Homologie: Alle Dateien zu Kapitel 4.2

Pep: Alle Dateien zu Berechnungen mit PEP (Kapitel 4.1), inklusive der Skripte

PP2A: Alle Dateien zum PP2A Homologiemodell

Skripts: siehe AAV-MM

Ras: Alle Dateien zu Kapitel 4.1

8.9 Anhang IX: Tabellen der Wasserstoffbrücken zwischen Liganden und Rezeptoren

8.9.1 Pepticinnamin E Analoga

Es wurden nur solche Wasserstoffbrücken berücksichtigt, deren gemessene Winkel innerhalb der in der Literatur angegebenen Spanne lag.

	Proteinatom[11]	Inhibitoratom	Länge (gemessen)	Länge (Literatur)	Winkel (gemessen)	Winkel (Literatur)	Bemerkung
109	Y 110 Ph-OH	H 3 BB-CO	2,84	1,9	129,87	110-180	B[12]
	Y 110 BB-NH	Y 1 CO2H	2,56	1,9	157,62	150-180	B
	Q 113 CONH	Y 1 CO2H	1,99	1,9	149,17	150-180	A
	A 397 BB-CO	Y 1 Ph-OH	1,83	1,9	123,89	110-180	A
112	D 596 CO2H	H 3 NH	2,91	1,8	129,98	100-140	B
	Q 113 CONH	Y 1 CO2H	2,25	1,9	118,1	110-180	B
	Q 113 CONH	Y 1 CO2H	2,62	1,9	147,91	150-180	B
	A 397 BB-CO	Y 1 Ph-OH	1,72	1,9	85,23	110-180	A
	S398 OH	Y 1 Ph-OH	1,92	1,9	111,72	90-130	A
114	K 655 NH2	Y 3 Ph-OH	2,82	1,9	122,36	150-180	B
	R 590 NEH	Y 3 Ph-OMe	1,96	1,9	146,45	150-180	A
	R 590 NZH	Y 3 Ph-OMe	1,93	1,8	146,82	150-180	A
	Y 660 Ph-OH	Z 4 BB-CO	1,76	1,9	161,03	150-180	A
	Y 112 Ph-OH	F 1 CO2H	1,91	1,9	95,9	90-130	A
	R 501 NZH	F 1 CO2H	1,72	1,8	139,91	150-180	A
110	Y 660 Ph-OH	Z 4 BB-CO	1,83	1,9	136,68	150-180	A
	R 590 NEH	Y 3 Ph-OMe	2	1,9	147,54	150-180	A
	R 590 NZH	Y 3 Ph-OMe	2	1,8	146,51	150-180	B
	Y 550 Ph-OH	F 1 CO2H	1,86	1,9	121,49	90-130	A
	K 655 NH2	Y 3 Ph-OH	1,7	1,8	157,99	150-180	A
	D 596 CO2H	Y 3 Ph-OH	1,9	1,8	91,59	100-140	B

[11] Zur Bezeichnung der Atome wurden folgende Abkürzungen verwendet: BB = Backbone, CONH = Seitenkette-Amid, Ph-OH= Phenolisches OH (Tyrosin), CO_2H= Carboxyatgruppe, NEH = ε-Stickstoff (Arginin), NZH = 2. Stickstoff der Guanidyleinheit (Arginin), NH = Aminogruppe, DKP = Diketopiperazin

[12] A) Winkel und Länge weichen max. 10 % vom Idealwert ab.

B) Winkel und Länge weichen zwischen 10 und 20 % vom Idealwert ab.

115	Y 112 BB-NH	Y 1 CO2H	2,79	1,9	161,16	150-180	B
	Q 113 CONH	Y 1 CO2H	1,91	1,9	124,27	110-180	A
	Q 113 CONH	Y 1 CO2H	2,72	1,9	128,54	150-180	B
	A 397 BB-CO	Y 1 Ph-OH	1,8	1,9	147,24	110-180	A
PepticinamminE	Y 660 Ph-OH	Z 4 BB-CO	1,85	1,9	119,44	90-130	A
	K 655 NH2	Y 3 Ph-OH	1,6	1,8	169,57	150-180	A
	D 596 CO2H	Y 3 Ph-OH	1,92	1,8	98,72	100-140	A
	R 590 NEH	Y 2 Ph-OH	1,96	1,9	151,94	150-180	A
	R 590 NZH	Y 2 Ph-OH	1,87	1,8	151,19	150-180	A
	R 590 NEH	Y 2 Ph-OMe	2,52	1,9	95,29	150-180	B
	R 590 NZH	Y 2 Ph-OMe	2,62	1,8	90,82	150-180	B
	N 111 CONH	DKP S CO	2,04	1,9	131,62	150-180	A
	Q 113 CONH	DKP G NH	1,9	1,9	110,51	110-180	A
	Q 113 CONH	DKP G NH	2,35	1,9	136,31	150-180	B
	R 501 NZH	DKP G CO	2,12	1,8	112,69	150-180	B
157	Y 112 BB-NH	Y 1 CO2H	2,06	1,9	162,56	150-180	A
	Q 113 CONH	Y 1 CO2H	1,79	1,9	131,36	110-180	A
	Q 113 CONH	Y 1 CO2H	2,97	1,9	120,72	150-180	B
	H 448 -N=	Y 1 Ph-OH	1,62	1,9	138,7	150-180	B
	H 147 NH	H 3 BB-CO	2,8	1,9	175,97	150-180	B

8.9.2 Nakijichinon-Analoga

Enzym/Inhibitor	Proteinatom	Inhibitoratom	Länge (gemessen)	Länge (Literatur)	Winkel (gemessen)	Winkel (Literatur)	Bemerkung
Tie-2/101	A905/N-H	C=O	1,75	1,9	146,18	150-180	B
	E903/C=O	OH	2,12	1,9	103,11	110-180	B
	N834/OD	Val-OH	2,29	1,9	133,31	110-180	B
	N834/ND	Val C=O	1,9	1,9	147,25	150-180	A
IGF1R/101	M1079/N-H	C=O	1,92	1,9	147,55	150-180	A
	E1077/C=O	OH	2,68	1,9	138,63	110-180	B
	D1083/N-H	Val-OH	1,97	1,9	163,56	150-180	A
	D1083/OD	Val-OH	2,00	1,9	125,26	110-180	A
Tie-2/99	A905/N-H	C=O	1,89	1,9	167,23	150-180	A
VEGFR-2/98	E562/C=O	OH	2,43	1,9	139,35	110-180	B
	C563/N-H	C=O	1,98	1,9	172,19	150-180	A
	N568/N-H	Ser-OH(carb)	2,97	1,9	107,78	90-130	B
	L840	Ser-OH	2,24	1,9	127,48	110-180	B
ErbB-2/6	Met82 BBNH	C=O	2,175	1,9	163,47	150-180	A

	Ser9 BBNH	SerCO2H	1,892	1,9	133,06	150-180	A
	Asp144 CO2H	SerCO2H	2,455	1,9	132,47	110-180	B
	Arg130 BBCO	SerOH	1,805	1,9	140,42	110-180	A
	Asn131 CONH	SerOH	2,985	1,9	142,2	110-180	B
IGF1R/100	Met1079C=O	CO2H	3,18	1,9	132,98	110-180	B
	GLY1003NH	CO2H	2,914	1,9	154,46	150-180	B
	ASP1083CO2H	OH	1,84	1,9	111,5	110-180	A
	ASN1137C=O	CO2H	1,84	1,9	107,92	110-180	A
	LYS1030	Chinon	1,64	1,9	142,11	150-180	B
	ASP1150CO2H	OH	2,69	1,9	58,71	110-180	B
	ASP1150CO2H	NH	1,96	1,9	141,1	110-180	A
Tie-2/104°	Glu hinge C=O	NH	2,14	1,9	129,31	110-180	A
	ALA hinge NH	C=O	1,91	1,9	162,71	150-180	A
	ASN rib	R-O-R	1,97	1,9	157,22	90-130	B
VEGFR-2/104b	Glu hinge	NH	2,28	1,9	112,12	110-180	A
	CYS hinge	C=O	2,19	1,9	123,22	150-180	B
	ASN rib	R-O-R	1,99	1,9	171,2	90-130	B

8.9.3 GTP-Peptid-Konjugate

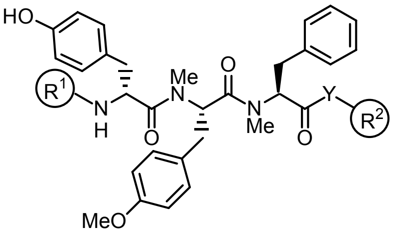
Verbindung	Proteinatom	Inhibitoratom	Länge (gemessen)	Winkel (gemessen)	Länge (Literatur)	Winkel (Literatur)
95	GTP_Rib-3'OH	Gly_5 NH	2,53	107,25	1,9	90-130
	GTP_Rib-5O	Gly_5 NH	2,98	89,01	1,9	90-130
	Asn_85_CONH	Met_4_CO	2,39	146,87	1,9	150-180
	Lys_117_NH2	Met_4_CO	2,78	142,93	1,9	150-180
91	GTP_Pur_N2	Glu_5_CO	2,53	169,71	1,9	150-180
	Asn_85_CONH	Glu_5_CO	2,25	133,98	1,9	150-180
	Val_12_NH	Ala_2_CO	2,98	130,31	1,9	150-180
	Val_12_O	Ala_2_NH	2,44	117,3	1,9	110-180
	Lys_117_NH2	Glu_5_CO	1,95	162,89	1,9	150-180
94	Val_12_CO	Met_2_CO	2,09	128,22	1,9	110-180
	Lys_117_NH2	Leu_5_CO	1,89	158,51	1,9	150-180
97	Asn_85_CONH	Gly_3_CO	2,03	137,39	1,9	150-180
	Lys_117_NH2	Gly_3_CO	1,86	143,28	1,9	150-180
	ASP_30_CO	Glu_5_CO	2,04	99,73	1,9	110-180
	GTP_Rib-2'-OH	Glu_5_CO	2,16	142,72	1,9	90-130
	Val_12_CO	AminoPyr_N	2,95	108,15	1,9	110-180
	GTP_G_PO4	AminoPyr_NH2	2,31	130,54	1,9	90-130

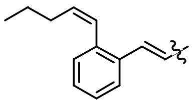
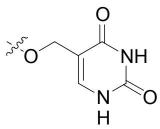
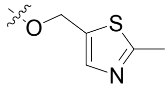
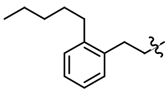
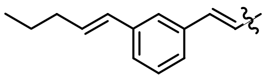
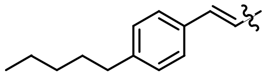
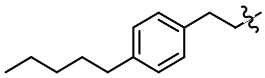
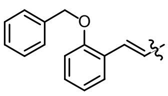
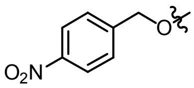
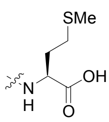
	GTP_G_PO4	AminoPyr_NH2	2,92	130,52	1,9	90-130

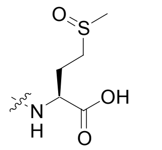
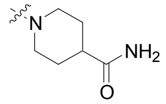
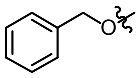
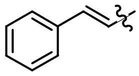
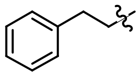
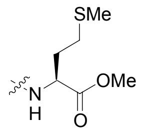
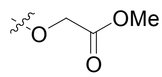
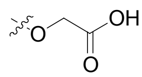
Kapitel 2 8.10 Anhang X: Kombinatorische Bibliothek von Pepticinnamin E Analoga

Tabelle A-X-1:

Diese Liste von Verbindungen wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Michael Thutewohl zur Verfügung gestellt.

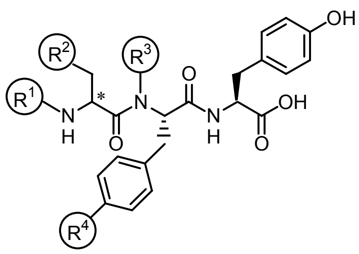


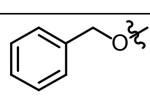
Nummer	Verb..	R1	Y–R2	FTase[a] (IC50) [µM]	FTase[b] (IC50) [µM]	MDCK-f3 Apoptose Inhib. Konz.[%]
1	**9**	-	-	112	-	-
2	**118**	-	-	-[c]	-	-
3	**116**	 = **a**		-[d]	>30	-[f]
4	**117**	**a**		-[d]	>30	-[f]
5	**119**	**a**	-OH	>50	57%[e]	-[f]
6	**120**	 = **b**	-OH	>50	6.4	50[g]; 100[h]
7	**121**	 = **c**	-OH	-[d]	>30	100[h]
8	**111**	 = **d**	-OH	-[d]	>30	100[h]
9	**113**	 = **e**	-OH	-[d]	>30	100[h]
10	**110**	 = **f**	-OH	9.3	57%[e]	-[f]
11	**124**	Fm = **g**	-OH	16.0		
12	**125**	 = **h**		42.4		

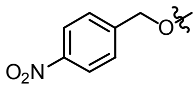
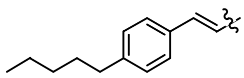
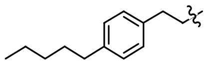
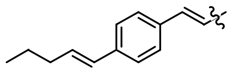
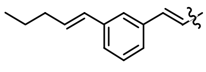
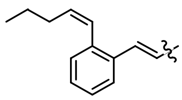
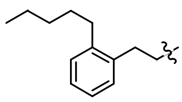
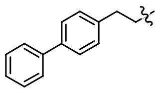
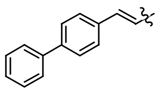
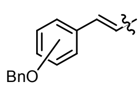
13	**126**	**h**		>50		
14	**127**	**h**		28.2		
15	**128**	**h**	-OH	>50	>30	
16	**114**	 **= i**	-OH	5.3	6.7	-[f]
17	**129**	 **= j**	-OH	16.2	12.8	
18	**130**	 **= k**		>50	>30	
19	**131**	**k**		-[d]	>30	-[f]
20	**132**	**k**		36.3	>30	-[f]
21	**133**	**k**	-OAll	-[d]	>30	
22	**134**	**k**	-OH	>50	>30	

[a]Fluorescence-Test mit Ratten-PFT[12]; [b]Radioaktivitätstest mit humaner PFT[13]; [c]keine Inhibition bei 200 µM Konzentration; [d]keine Inhibition bei 50 µM Substanzkonzentration; [e]57% Inhibition bei 50 µM Substanzkonzentration; [f]keine Apoptose ei 100 µM SubstanzKonzentration; [g]Apoptose bei 50 µM Substanzkonzentration; [h]Apoptose bei 100 µM Substanzkonzentration.

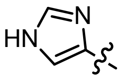
Teil 2::



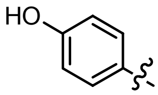
Nr.	Verbindung	R[1]	R[2]	*	R[3]	R[4]	PFT[a] IC$_{50}$ [µM]	PFT[b] IC$_{50}$ [µM]	MDCK-f3 Apoptose, Inhibitor Konz.[%]
1	**135**	 **= i**	HOPh-	D	Me	H	>50	>30	
2	**136**	**i**	HOPh-	D	H	H	>50	>30	-[d]
3	**137**	**i**	HOPh-	D	H	OH	-[c]	>30	
4	**138**	**i**	HOPh-	L	H	OH	-[c]	>30	

5	**139**	**i**	Ph-	L	H	H	24.0	>30	
6	**140**	**i**	Imid	L	H	H	>50	>30	
7	**141**	**i**	Imid	L	Me	H	13.3	30.5	-[d]
8	**142**	**i**	Imid	D	Me	H	8.0	6.4	-[d]
9	**143**	 = **l**	Imid	D	H	H	57.9	1.1	-[d]
10	**144**	 = **d**	Imid	D	H	H	-[c]	>30	-[d]
11	**145**	**d**	Imid	D	H	H	8.1		
12	**146**	 = **e**	Imid	D	H	H	9.3		
13	**147**	**e**	Imid	L	H	H	7.1	1.1	-[d]
14	**148**	**e**	Imid	L	Me	H	11.6	16.9	
15	**112**	**e**	Imid	D	Me	H	10.5		-[d]
16	**149**	 = **l**	Imid	D	H	H	31.0		
17	**150**	 = **c**	Imid	D	H	H	31.2		
18	**151**	 = **a**	Imid	D	H	H	24.4		
19	**152**	 = **b**	Imid	D	H	H	31.6		
20	**153**	 = **m**	Imid	D	H	H	52.4		
21	**154**	 = **n**	Imid	D	Me	H	7.7	22.1	
22	**155**	*ortho*  = **o**	Imid	D	H	H	15.3	1.0	-[d]
23	**109**	*ortho* **o**	Imid	L	H	H	6.4	19.2	-[d]
24	**156**	*meta* **o**	Imid	L	H	H	12.5		
25	**157**	*meta* **o**	Imid	D	H	H	>50	7.6	
26	**158**	*para* **o**	Imid	L	H	H	8.2		
27	**159**	*para* **o**	Imid	D	H	H	23.1	4.1	

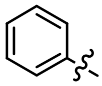
[a]Fluorescence-Test mit Ratten-PFT[12]; [b]Radioaktivitätstest mit humaner PFT[13]; [c]keine Inhibition bei 50 µM Konzentration; [d]keine Inhibition bei 100 µM Substanzkonzentration;



Imid



HOPh-



Ph-

Kapitel 3 8.11 Anhang XI: Übersicht über die für die vorliegende Arbeit relevanten Signalwege

Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Waldmann für die interessante Themenstellung sowie den Freiraum und die Unterstützung bei der Gestaltung der Arbeit.

Herrn Dr. Timo Krämer, Herrn Dr. Oliver Huttenloch, Herrn Dr. Michael Thutewohl, Herrn Dipl. Chem. Laurent Bialy, Herrn Dr. Courtney Aldrich und Herrn Dr. Laurent Soulère danke ich für die angenehme Laboratmosphäre. Bei der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und die hohe Einsatzbereitschaft während des Umzuges nach Dortmund bedanken.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. Armin Widmer, Novartis AG für die großzügige Bereitstellung der Software WitnotP, sowie seine Ratschläge für die Installation auf einer SGI O2 Irix 6.5 Maschine. Herrn Dr. Claus Ehrhardt, Novartis AG danke ich für die zahlreichen Hilfestellungen beim Auffinden versteckter WitnotP Funktionen sowie für das Überlassen einiger Scripte zur Arbeit mit WitnotP. Herrn Dr. Pascal Furet, Novartis AG danke ich für die Zusammenarbeit und wertvolle Tipps für die Arbeit mit Rezeptor Tyrosin Kinasen.

Bei den Mitarbeitern von Prof. Dr. Wittinghofer möchte ich für die konstruktive Zusammenarbeit danken.

Der EDV Abteilung des Max-Planck-Institutes für molekulare Physiologie danke ich für die prompte und stets kompetente Hilfe bei der Beseitigung von Windows-spezifischen Problemen. Frau Dr. Ingrid Vetter und Herrn Dr. Christoph Schwittek danke ich für die freundliche Unterstützung beim Bewältigen der „Spezialitäten“ von UNIX sowie Systemabstürzen.

Den analytischen Abteilungen der Universitäten Karlsruhe und Dortmund danke ich für die Messung zahlreicher Spektren.

Herrn Dr. Albert danke ich für die tatkräftige Hilfe bei der Organisation des Umzuges der Arbeitsgruppe von Karlsruhe nach Dortmund.

Bei der BASF AG, insbesondere Herrn Brugger, möchte ich mich für die Durchführung der Edman-Sequenzierung bedanken.

Dem Fonds des Verbandes der chemischen Industrie, der Studienstiftung des deutschen Volkes und e-fellows.net möchte ich für die großzügige finanzielle Unterstützung meiner Promotion danken.

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name:	Lars Arne Kissau
Geburtsdatum /-ort:	07.05.1973 in Karlsruhe
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

AUSBILDUNG

1983-1986	Kardinal-von-Galen-Gymnasium, Münster
1986-1990	Mountain Lakes Highschool, Mountain Lakes, NJ, USA
1990	Highschool Abschluss (Graduation)
1990-1992	Werner-Heisenberg-Gymnasium, Bad Dürkheim
1992	Abitur
1992	Ausbildung zum Rettungssanitäter beim DRK
1993-1998	Chemiestudium an der Universität Freiburg i. Br.
1995	Vordiplomprüfung, Note: Sehr Gut
1998	Diplomprüfung, Note: Sehr Gut
1999-2002	Dissertation bei Prof. Dr. H. Waldmann, an der Universität Karlsruhe (02/1999-10/1999) und an der Universität Dortmund und am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund (11/1999-12/2002)

ERSATZDIENST

Zivildienst als Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz, Kreisverband Bad Dürkheim e.V.

AUSZEICHNUNGEN

1996-1998	Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
1999-2001	Kekulé-Stipendium des Fonds der Chemischen Industrie
1999-2001	Promotionsstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
Seit 2001	Online-Stipendium von e-fellows.net